

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Análise Vestigial de Substâncias de Abuso

André Martins Segurado

Mestrado em Química
Química Analítica

Dissertação orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Análise Vestigial de Substâncias de Abuso

André Martins Segurado

Mestrado em Química
Química Analítica

Dissertação orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas ... é quem faz
as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

Prefácio

A presente dissertação foi elaborada no âmbito da conclusão do Mestrado em Química (Ramo de Química Analítica), da *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)*, encontrando-se dividida em duas partes distintas.

A primeira parte da presente dissertação, foi elaborada como resultando de um período de estágio, realizado no laboratório de preparação de amostras no *Dipartimento di Chimica e Farmacia - Università degli Studi di Sassari* (Itália), tendo como principal objetivo o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a deteção de substâncias de abuso, aditivos e/ou substâncias psicoativas, em amostras alimentares. Durante o período de estágio, o signatário contribuiu para o desenvolvimento de um método analítico para despiste de substâncias de abuso em amostras de molho de soja adulterado. Tendo em consideração que as matrizes alimentares são matrizes muito complexas e, por forma a alcançar uma análise fiável e precisa, sem potenciais interferentes, foi desenvolvido e proposto um método com recurso a extração em fase sólida seguido de análise por cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa *Tandem* (SPE/LC-MS/MS).

Numa segunda parte, o signatário realizou o seu trabalho experimental no *Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar* da *FCUL*, onde desenvolveu uma nova abordagem analítica para o despiste de catinonas sintéticas em saliva, com recurso a microextração adsortiva em barra seguido de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (BA μ E-LD/GC-MS). Neste sentido, estudou-se com detalhe os principais desafios e limitações analíticas.

Tendo em consideração os estudos efetuados, o signatário adquiriu experiência na área da Química Analítica, no domínio das técnicas de preparação de amostras, cromatográficas e hifenadas, atualmente determinantes no controlo de substâncias prioritárias com impacto na sociedade.

Os trabalhos efetuados foram alvo de divulgação na comunidade científica, através de comunicações escritas (poster) em diversos congressos e conferências, nacionais e internacionais.

❖ **Comunicações Escritas (Poster):**

- ✓ Segurado, A.M. ; Ahmad, S.M. ; Neng, N.R.; Queirós, C. ; Gaspar, H. ; Nogueira, J.M.F.; “*BAμE – A New Approach for the Analysis of Psychoactive Cathinones in Oral Fluid*”; 40th International Symposium on Capillary Chromatography; Riva del Garda – Itália; Maio-Junho 2016

- ✓ Segurado, A.M. ; Ahmad, S.M. ; Neng, N.R.; Queirós, C. ; Gaspar, H. ; Nogueira, J.M.F.; “*Application of a New Analytical Approach for the Determination of Psychoactive Cathinones in Oral Fluid*”; XVI Latin-American Congress on Chromatography & 9th National Meeting on Chromatography; Lisboa – Portugal; Janeiro 2016

- ✓ Segurado, A.M. ; Burrai, L. ; Nieddu, M. ; Accioni, F.; Nogueira, J.M.F. ; Boatto, G.; “*Detection and Quantification of Drugs of Abuse in Soy Sauces by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*”; MASSA 2015 - Convegno della Divisione di Spettrometria di Massa; Alghero – Itália; Junho 2015

Agradecimentos

De uma forma geral agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me apoiaram e ajudaram, ou de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira a oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigação e de poder desenvolver a minha dissertação sob a sua orientação. Agradeço-lhe pelos conselhos, disponibilidade para me ajudar e responder às minhas dúvidas, pela paciência e por todo o tempo despendido na ajuda de revisões e correções de trabalhos escritos.

Um agradecimento, igualmente especial, aos professores que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e que me fizeram acreditar nas minhas capacidades. Uma especial atenção à Doutora Helena Gaspar, cujo contributo foi essencial para realização da minha dissertação, não apenas pelos padrões fornecidos, mas igualmente pela sua disponibilidade e palavras de incentivo.

De igual modo, gostaria de agradecer ao Professor Gianpiero Boatto pela oportunidade de realizar um período de estágio no *Dipartimento di Chimica e Farmacia - Università degli Studi di Sassari (Itália)*. No entanto, esta experiência não seria possível sem o apoio dos gabinetes internacionais de ambas as instituições, às quais envio o meu profundo agradecimento.

O presente trabalho não seria realizado de igual forma sem o apoio incondicional do Samir Ahmad, cuja amizade e os conselhos revelaram ser imprescindíveis para a conclusão desta dissertação. Agradeço ao Doutor Nuno Neng, Alessandra Ide, Alexandra Fernandes, Jaderson Schneider, Doutora Ana Marques e Rodrigo Osawa que me souberam acolher muito bem no laboratório/faculdade, assim como pela boa disposição, disponibilidade, amizade e conselhos.

Um agradecimento, muito especial aos meus colegas de mestrado, David Pereira e Juliana Correia, que me acompanharam ao longo desta etapa da minha vida. Um enorme agradecimento a Filipa Oliveira e ao Nelson José pelo apoio, palavras de

incentivo e sobretudo pela paciência em aturarem os meus desabafos nos momentos menos bons.

Os maiores agradecimentos vão para os meus avós, mãe e irmã que foram o meu pilar ao longo desta jornada e aos quais eu dedico a presente dissertação. Agradeço à minha irmã, Rita Segurado, as palavras de apoio e incentivo sempre demonstradas através do seu “feitio peculiar”. À minha mãe, Filomena Martins, agradeço o amor incondicional e o constante sacrifício de me aturar, assim como o seu apoio, força e compreensão ao longo do meu percurso académico. António Segurado, Antónia Segurado, Manuel Martins e Manuela Martins agradeço todo o apoio que me deram ao longo destes anos, sem vocês dificilmente teria conseguido chegar onde cheguei e sobretudo não teria conseguido ultrapassar mais uma etapa da minha vida, espero que de alguma forma se encontrem orgulhosos do meu trabalho.

Obrigado por fazerem parte da minha vida!

Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

AC	Carvão ativado
ACN	Acetonitrilo
CA	Concentração de analito
CCTV	Chinese Central Television
CE	Energia de colisão
CI	Ionização química
CIS	Concentração do padrão interno
CXP	Collision cell exit potential
DGS	Direção – Geral de Saúde
DP	Declustering potential / Voltagem do cone
ECD	Detetor de captura eletrónica
EI	Eletroionização
ELCD	Detetor de condutividade
ELD	Detetor eletroquímico
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
EP	Entrance potencial
ESI	Ionização por eletrospray
EWS	Sistema de Alerta Rápido da União Europeia
FID	Detetor de ionização por chama
FLD	Detetor de fluorescência
FP	Focus potential
GC	Cromatografia em fase gasosa
IS	Padrão interno
LC	Cromatografia em fase líquida
LD	Dessorção líquida
LLE	Extração líquida-líquida
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LPC/PJ	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária
LVI	Large volume injection
MeOH	Metanol
MRM	Multiple reaction monitorization
MS	Espectrometria de massa
NaCl	Cloreto de sódio
NIR	Espectroscopia infravermelho
NMR	Espectroscopia de ressonância magnética
NPD	Detetor de azoto-fósforo
NPS	Nova Substância Psicoativa
OEDT	Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência
QqQ	Analizador triplo quadrupolo
RAM	Região Autónoma da Madeira
RID	Detetor de índice de refração
RSD	Desvio padrão relativo
S/N	Razão sinal ruído
SA	Sinal instrumental do analito
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SIM	Monitorização de iões seleccionados
SIS	Sinal instrumental do padrão interno

SPE	Extração em fase sólida
TCD	Detetor de condutividade térmica
TOF	Analizador de tempo de voo
UHPLC	Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime
USDA	United States Department of Agriculture
USFDA	US Food and Drug Administration
UV-VIS	UV-Vísivel
WADA	World Anti-Doping Agency
WTO	World Trade Organization
XIC	Extract ion chromatogram
k'	Fator de capacidade
$\log K_{o/w}$	Coeficiente de partição
N	Eficiência
pH_{pzc}	Ponto de carga zero
$\text{p}K_a$	Constante de acidez
r^2	Coeficiente de determinação
Rs	Resolução
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t_R'	Tempo de retenção ajustado
W	Largura da base de um pico cromatográfico simétrico
α	Seletividade
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
Da	Unidade de massa atômica
eV	Eletrão-volt
g	Grama
h	Horas
L	Litro
m	Metro
m/v	Razão massa/volume
m/z	Razão massa/carga
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitros
psi	Medida de pressão
rpm	Rotação por minuto
v	Volume
V	Volt
μg	Micrograma

Índice

	Página
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Parte I - Identificação e Quantificação de Substâncias de Abuso em Molho de Soja Adulterado	1
Abstract	3
Resumo	5
1. Introdução	7
1.1. Molho de Soja Chinês	10
1.1.1. Adulteração de molho de soja chinês	11
1.2. O Consumo de Substâncias de Abuso na China	13
1.3. Técnicas de Preparação de Amostras – Extração em Fase Sólida (SPE)	14
1.4. Técnicas Cromatográficas	16
1.4.1. Cromatografia em fase líquida (LC)	19
1.4.2. A cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa <i>Tandem</i> (LC-MS/MS)	20
1.5. Controlo de Qualidade em Molho de Soja Chinês	23
1.6. Objetivos	24
2. Parte Experimental	25
2.1. Regentes, Materiais e Amostras	27
2.2. Instrumentação	27
2.3. Método Experimental	28
2.3.1. Otimização das condições MS/MS	28
2.3.2. Condições Experimentais (LC)	29
2.3.3. Critérios utilizados para análise qualitativa e metodologia quantitativa dos analitos alvo	30
2.4. Metodologia de Extração	31
2.5. Validação	32
2.6. Análise de Amostras Reais	32
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Limiares Analíticos do Método – Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	35
3.2. Gama Linear Dinâmica	36
3.3. Efeito de Matriz	37
3.4. Seletividade	38
3.5. Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermédia	39
3.6. Análise de Amostras Reais	41
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	43

Parte II - Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica Alternativa para Despistagem de Novas Substâncias Psicoativas em Saliva	47
Abstract	49
Resumo	51
1. Introdução	53
1.1. O Consumo de Novas Substâncias Psicoativas em Portugal	57
1.2. A “Nova Lei das Drogas” – A Legislação Portuguesa	59
1.3. Catinonas Sintéticas: da folha de <i>khat</i> aos “Sais de Banho”	60
1.3.1. Estrutura química das catinonas sintéticas	62
1.3.2. Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas	64
1.3.3. Farmacocinética das catinonas sintéticas	65
1.3.4. Farmacodinâmica das catinonas sintéticas	65
1.4. Análise de Catinonas Sintéticas: Técnicas e Desafios	66
1.5. Técnicas Hifenadas: Sistema GC-MS	67
1.5.1. Análise de catinonas sintéticas por GC-MS	70
1.6. Técnicas de Microextração Adsorptiva – A Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E)	71
1.7. Análise de Catinonas Sintéticas em Saliva	73
1.8. Objetivos	74
2. Parte Experimental	75
2.1. Reagentes, Materiais e Amostras	77
2.2. Equipamentos e Instrumentação	78
2.3. Método Experimental	79
2.3.1. Preparação de soluções padrão	79
2.3.2. Condições instrumentais	80
2.3.3. Calibração instrumental	80
2.3.4. Preparação de diapositivos BA μ E	81
2.3.5. Ensaio de otimização do processo de extração	81
2.4. Método Experimental para a Metodologia de Despistagem de Catinonas Sintéticas em Saliva	82
2.4.1. Condições instrumentais	82
2.4.2. Linearidade instrumental	82
2.4.3. Recolha e preparação de amostras	83
3. Discussão e Resultados	85
3.1. Condições Instrumentais e o Comportamento de Catinonas Sintéticas	87
3.2. Otimização da Metodologia de Extração	93
3.2.1. Seleção do sorvente para o diapositivo BA μ E	93
3.2.2. Otimização das etapas de retroextração	97
3.2.2.1. Tipo de solvente a utilizar durante a retroextração	97
3.2.2.2. Tempo de retroextração	98
3.2.3. Otimização das etapas de extração	100
3.2.3.1. Efeito da velocidade de agitação	100
3.2.3.2. Efeito do tempo de equilíbrio	101
3.2.3.3. Efeito do pH	102
3.2.3.4. Efeito do modificador orgânico	103
3.2.3.5. Efeito da força iónica	105

3.3. Adequação para um Método de Despistagem de Catinonas Sintéticas em Amostras de Saliva	107
3.3.1. Linearidade da resposta instrumental e limites de detecção (LODs)	109
3.3.2. Avaliação da eficiência de extração utilizando a metodologia BAμE-LD/GC-MS(SIM) em amostras aquosas e saliva	111
3.3.3. Seletividade e capacidade de identificação da metodologia desenvolvida para o despiste de catinonas sintéticas em saliva	112
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	115
Considerações Finais	119
Referências Bibliográficas	121

Índice de Figuras

Página

Parte I - Identificação e Quantificação de Substâncias de Abuso em Molho de Soja Adulterado

1. Introdução

Figura 1.1 - Estrutura química da Ketamina, Metanfetamina e MDMA (Ecstasy)	13
Figura 1.2 - Diferentes mecanismos de extração utilizados em SPE	15
Figura 1.3 - Etapas de um procedimento SPE	16
Figura 1.4 – Separação cromatográfica de uma mistura (A e B) e respectivos parâmetros de retenção	18
Figura 1.5 – Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida (LC)	20
Figura 1.6 – Exemplo ilustrativo da ionização por <i>electrospray</i> (ESI)	21
Figura 1.7 – Analisador de massa triplo quadrupolo (MS/MS)	22

2. Parte Experimental

Figura 2.1 – Sistema LC-MS/MS, utilizado para a realização do trabalho experimental	27
Figura 2.2 – Metodologia SPE adotada no presente trabalho	31

3. Resultados e Discussão

Figura 3.1. - Cromatogramas de uma amostra fortificada para um nível médio de fortificação (200 µg/L)	41
Figura 3.2 - Cromatogramas de uma amostra real (S2)	42

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Parte II - Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica Alternativa para Despistagem de Novas Substâncias Psicoativas em Saliva**1. Introdução**

Figura 1.1 – Desafios associados ao fenómeno das novas substâncias psicoativas (NPS's)	56
Figura 1.2 – Notícias na comunicação social portuguesa sobre o fenómeno das NPS's	58
Figura 1.3 - A “Nova Lei das Drogas” noticiada na comunicação social	59
Figura 1.4 – Produtos vendidos em <i>smartshops</i> , que contém catinonas sintéticas na sua composição	61
Figura 1.5 – Estrutura química da anfetamina, catinona e estrutura genérica das catinonas sintéticas	63
Figura 1.6 – Diferentes catinonas sintéticas e as suas estruturas	64
Figura 1.7 – Cromatógrafo gasoso acoplado a um detetor de massa (GC-MS)	67
Figura 1.8 – Microextração sortiva	71
Figura 1.9 - Microextração adsortiva em barra (BA μ E)	72

2. Parte Experimental

Figura 2.1 – Sistema GC-MS utilizado (Agilent Technologies)	79
-------------------------------------------------------------	----

3. Resultados e Discussão

Figura 3.1 – Cromatograma obtido pela injeção de uma solução, contendo 10000 μ g/L dos analitos, onde se verificam os respetivos produtos de degradação, por GC-MS (<i>full-scan</i>).	88
Figura 3.2 - Cromatograma obtido pela injeção de uma solução, contendo 10000 μ g/L dos analitos, após a substituição do <i>liner</i> por LVI-GC-MS (<i>full-scan</i>)	89
Figura 3.3 – Efeito da resposta instrumental obtida, variando a temperatura final de injeção (200°C e 300°C) obtido por LVI-GC-MS(SIM)	91
Figura 3.4 – Cromatograma de uma solução com as cinco catinonas sintéticas (1000 ng/mL) em estudo, obtidos por LVI-GC-MS (SIM) nas condições instrumentais otimizadas	92
Figura 3.5 – Etapas de otimização BA μ E	93
Figura 3.6 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes carvões ativados testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	94
Figura 3.7 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes materiais poliméricos testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	95

Figura 3.8 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes solventes extratores testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	97
Figura 3.9 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes tempos de retroextração testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	98
Figura 3.10 - Comparação entre a resposta instrumental obtido entre uma solução-padrão sujeita a um período de 60 minutos sob tratamento ultrassónico e uma solução-padrão não sujeita a este tipo de tratamento analisadas em duplicado; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	99
Figura 3.11 - Recuperação média obtida dos analitos para as diferentes velocidades de agitação testadas; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	101
Figura 3.12 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes tempos de extração testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	102
Figura 3.13 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes valores de pH do meio; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	103
Figura 3.14 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes níveis de MeOH testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	104
Figura 3.15 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes níveis NaCl testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM)	105
Figura 3.16 – Pico de degradação da Metilona, Fledrona, MDPV e os seus respetivos produtos de degradação	108
Figura 3.17 – Cromatograma obtido de uma amostra de saliva fortificada (500 µg/L) e uma amostra de saliva não fortificada, análise efetuada por BAµE-LD/GC-MS(SIM)	114

Índice de Tabelas

Página

Parte I - Identificação e Quantificação de Substâncias de Abuso em Molho de Soja Adulterado

1. Introdução

2. Parte Experimental

Tabela 2.1 – Parâmetros otimizados das condições MS/MS	29
--------------------------------------------------------	----

3. Resultados e Discussão

Tabela 3.1. – Limiares analíticos obtidos para cada um dos analitos de interesse nas condições LC-MS/MS(MRM) utilizadas	35
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3.2 – Coeficientes de determinação (r^2) e equação da reta ($Y=aX+b$) para cada um dos analitos de interesse (Ketamina, MDMA e Metanfetamina)	36
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3.3 – Efeito matriz (%) para cada analito de interesse, a três níveis de concentração (25, 200, 400 µg/L)	38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3.4 – Recuperação média (%), repetibilidade (RSD) e precisão intermédia (RSD) obtidas no método desenvolvido para cada analito a três níveis de concentração diferentes (25, 200, 400 µg/L)	40
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Parte II - Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica Alternativa para Despistagem de Novas Substâncias Psicoativas em Saliva

1. Introdução

Tabela 1.1 – Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas	65
-----------------------------------------------------------------------------	----

2. Parte Experimental

3. Resultados e Discussão

Tabela 3.1- Tabela informativa contendo as catinonas sintéticas em estudo, com as respectivas estruturas químicas e informações relevantes (pico molecular, pico base e outros íões fragmento) para análise por GC-MS	87
Tabela 3.2 – Tempo de retenção (t_R) e íões selecionados para identificação das catinonas sintéticas, em estudo	90
Tabela 3.3 – Precisão (RSD), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), gama de linearidade e coeficiente de determinação (r^2) das cinco catinonas sintéticas em estudo, obtidos por GC-MS nas condições instrumentais otimizadas	92
Tabela 3.4 – Condições experimentais otimizadas para a metodologia BA μ E-LD	106
Tabela 3.5 – Linearidade dos analitos analisados por GC-MS(SIM), utilizando <i>splitless</i> como modo de injeção e na presença de produtos de degradação.	107
Tabela 3.6 - Precisão instrumental (RSD), limite de detecção (LOD), gama de linearidade e coeficiente de determinação (r^2), tempos de retenção (t_R) das três catinonas sintéticas em estudo, obtidos por GC-MS nas condições instrumentais otimizadas	110
Tabela 3.7 – Pico base, fragmentos <i>target</i> com a abundância relativa de cada um ao pico base respectivo e a tolerância máxima permitida para a identificação inequívoca de cada composto	111
Tabela 3.8 - Recuperação obtida em 25 mL de água ultra-pura fortificada com 10 μ g/L e recuperação obtida em 24,5 mL de água ultra-pura + 500 μ L de saliva fortificada	112
Tabela 3.9 – Resultados obtidos de cinco amostras de saliva fortificadas, analisadas em duplicado por BA μ E-LD/GC-MS(SIM)	114

PARTE I

Identificação e Quantificação de Substâncias de Abuso em Molho de Soja Adulterado

André Martins Segurado

Orientado por:

Professor Doutor Gianpiero Boatto

e

Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Abstract

Food suppliers are suffering from an intensified price competition with each other, and as a result of this economic pressure, many of them reduce the production cost by decreasing the product quality. Taking into account the number of incidents observed in the last decade, largely reported by the media, involving chinese products, the global concern for such items increased exponentially.

Soy sauce is a basic ingredient in Chinese, Japanese and other Asian cooking that is taking popularity in Western cuisine due to its intense taste, characteristic aroma and desirable components, including proteins and antioxidants. In 2003, the social media community reported a case of “fake” soy sauce, produced in China, which was labeled as employing the “latest bioengineering technology”. Investigation and inspections to the manufacturing place revealed that this “amino acid syrup” was a form of *L-Cysteine*, extracted from human hair obtained from the floors of hair salons, barber shops and hospitals. This practice is potentially dangerous because many substances, such as drugs of abuse, accumulate in the hair.

This work proposes an analytical methodology by combining solid phase extraction combined with liquid chromatography coupled to *Tandem* mass spectrometry (SPE/LC-MS/MS) for the determination of ketamine, MDMA and methamphetamine in soy sauce. The experimental conditions allowed good analytical limits ($\text{LOD} \leq 0.6 \mu\text{g/L}$; $\text{LOQ} \leq 1.9 \mu\text{g/L}$) for the three target compounds.

During the validation process, the methodology, SPE/LC-MS/MS(MRM), showed excellent linearity ($r^2 > 0.997$) for a ranging from 10.0 to 400.0 $\mu\text{g/L}$. The matrix effect was studied by "pos-extrated spiked" for three concentration levels (high, medium and low), where it was observed a suppression of ions formation during ionization by *electrospray* (ESI), but with acceptable levels ($\leq -12 \%$). There weren't any interfering substances or significant differences in the chromatographic profile for three different batches of soy sauce analysis.

The recovery for the three analytes was evaluated at low, medium and high (25, 200 and 400 $\mu\text{g/L}$) concentrations and showed that the extraction method is efficient

providing average recoveries greater than 89 %. The intra-day and inter-day assays revealed a $RSD \leq 11.6 \%$ and $RSD \leq 13.3 \%$, respectively.

The proposed methodology was applied to seventeen samples of soy sauce acquired in chinese ethnic shops, where any traces ($< LODs$) of the studied substances were observed.

KEYWORDS:

Food Adulteration

Food Analysis

Soy sauce

Solid Phase Extraction (SPE)

Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Resumo

Como resposta à pressão económica, muitas empresas da indústria alimentar reduzem o custo de produção diminuindo a qualidade do produto. Tendo em consideração o número de incidentes observados na última década, amplamente divulgadas pelos meios de comunicação social, envolvendo produtos alimentares chineses, a preocupação global, relativamente a este tipo de produtos, aumentou significativamente.

O molho de soja é um ingrediente básico na culinária chinesa e japonesa que tem ganho popularidade na cozinha ocidental, tendo em conta o sabor intenso, aroma característico e componentes desejáveis, nomeadamente proteínas e antioxidantes. Em 2003, através da comunicação social, surgiram relatos de adulteração efetuada a molho de soja, produzido na China, que era rotulado como "derivado da mais recente tecnologia de bioengenharia". Investigações e inspeções ao local de fabricação, revelaram que este "xarope de L-Cisteína" era extraído de cabelo humano obtido a partir de salões de beleza, barbearias e hospitais. Esta prática é potencialmente perigosa, uma vez que muitas substâncias, como por exemplo as drogas de abuso, são “armazenadas” no cabelo.

O presente trabalho propõe uma metodologia analítica, com recurso a extração em fase sólida combinada com a cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa *Tandem* (SPE/LC-MS/MS), para a determinação de ketamina, MDMA e metanfetamina em molho de soja. As condições experimentais usadas, permitiram bons limiares analíticos ($LOD \leq 0,6 \mu\text{g/L}$; $LOQ \leq 1,9 \mu\text{g/L}$) para os três compostos em estudo.

Durante o processo de validação a metodologia adotada, SPE/LC-MS/MS(MRM, demonstrou excelente linearidade ($r^2 > 0,997$), para uma gama de trabalho compreendida entre 10,0 e 400,0 $\mu\text{g/L}$. O efeito matriz foi estudado, com recurso a “fortificação após extração”, realizado para três níveis de concentração (alta, média e baixa), tendo-se verificado uma supressão de iões durante a ionização por *electrospray* (ESI), mas com níveis aceitáveis ($\leq -12 \%$). Não foi detetado nenhum tipo de

substâncias interferentes, nem diferenças significativas nos perfis cromatográficos provenientes da análise efetuada a três lotes diferentes de soja.

A recuperação dos três analitos foi avaliada para baixa, média e alta (25, 200 e 400 µg/L) concentração, tendo-se verificado que o método de extração é eficiente, apresentando recuperações médias superiores a 89 %. A repetibilidade e a precisão intermédia indicaram $RSD \leq 19,6 \%$ e $RSD \leq 13,3 \%$, respetivamente.

A metodologia proposta foi aplicada a dezassete amostras de soja, adquiridas em estabelecimentos comerciais chineses, não se tendo observado vestígios ($< LODs$) das três substâncias estudadas.

PALAVRAS-CHAVE:

Adulteração Alimentar

Análise Alimentar

Molho de Soja

Extração em Fase Sólida (SPE)

Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem (LC-MS/MS)

1. Introdução

A adulteração de produtos alimentares e a fraude alimentar representa um problema não apenas para os países em desenvolvimento, mas também para os países desenvolvidos. Estes fenómenos são considerados um grave problema global, especialmente quando existe uma fraca disponibilidade do produto alimentar e uma elevada procura do mesmo no mercado[1].

Atualmente, as empresas da área alimentar sofrem de uma concorrência de preços intensificada entre si, resultando numa pressão em termos de corte dos custos para os fornecedores mundiais [2]. Como resposta a esta pressão económica, muitas empresas da indústria alimentar reduzem o custo de produção diminuindo a qualidade do produto. Muitas vezes, a fraude alimentar é realizada com o pleno conhecimento e compreensão dos sistemas de vigilância e controle, assim como com o conhecimento dos testes analíticos que são atualmente utilizados nas fronteiras e dentro dos países em questão [1].

A nível mundial, no decorrer do ano de 2007, registou-se um elevado número de fornecedores alimentares que, de modo a responder a pressão económica da indústria, procediam a adulteração dos seus produtos. Assim, a preocupação global sobre segurança alimentar aumentou exponencialmente, tendo sido particularmente visível para produtos importados da China [2].

Na realidade, a preocupação mundial relativamente a alimentos produzidos na China, remota ao ano de 2001, quando este país ingressou na *World Trade Organization* (WTO) e dissipou os seus produtos alimentares, economicamente mais vantajosos, de forma exponencial. De acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA), a China é a terceira maior fonte de importações de alimentos nos Estados Unidos da América (EUA) [3].

Para os EUA, a China é o principal fornecedor de alguns produtos alimentares específicos, como por exemplo sumo de maçã, alho, peixes e crustáceos. No entanto, os alimentos designados de produtos diários, como o grão ou a carne, assim como produtos lácteos não são, de um modo geral importados da China [3].

Tendo em consideração o número de incidentes observados na última década, largamente relatados pela comunicação social (leite adulterado, comida para animais

fraudulenta, etc.) relacionados com importações chinesas, gerou-se uma onda de preocupação no que diz respeito a segurança alimentar com os produtos provenientes deste país [3].

O incidente, relacionado com importações chinesas mais conhecido, e provavelmente mais mediático, é o incidente da adulteração de leite com recurso a melamina. A melamina, é um produto químico industrial, usado na produção de plásticos e fertilizantes, que pode ser adicionada ao leite, de forma a aumentar a quantidade de azoto presente no alimento [4]. Como resultado desta adulteração, intencional e premeditada, seis bebês chineses morreram e cerca de 300.000 crianças sofreram doenças renais após o consumo [3]. Desde então, os temas relacionados com a segurança alimentar, tornaram-se um tema tão sensível na China, que algumas pesquisas na *internet* e *websites* especializados sobre os escândalos foram bloqueados pelo governo chinês [5].

Em 2009, de acordo com o estudo realizado pela *US Food and Drug Administration* (FDA), registou-se um aumento do número de violações em relação à presença de resíduos de medicamentos veterinários e aditivos perigosos em produtos alimentares importados da China [3].

1.1. Molho de Soja Chinês

O molho de soja é caracterizado como tendo um aspeto escuro e gosto salgado. Este molho pode ser produzido através da fermentação de grãos de soja cozidos ou torrados. Este produto alimentar é um ingrediente básico em produtos alimentares asiáticos, sendo popular nestes países devido ao seu sabor intenso, aroma característico e componentes desejáveis, nomeadamente proteínas e antioxidantes (isoflavonas e enzima superóxido dismutase) [6]. Este produto alimentar é considerado “o sal” dos países asiáticos [7].

Este produto alimentar pode ser produzido através da fermentação da soja, cereais (geralmente trigo) e sal. Durante a fermentação, ocorre, essencialmente, a hidrólise enzimática de proteínas e outros constituintes da soja e/ou trigo, com formação

de peptídeos, aminoácidos, açúcares, alcoóis etc.[7]. Os molhos de soja japoneses são produzidos com grãos de soja e trigo, enquanto o de origem chinesa é produzido apenas com recurso aos grãos de soja [8].

Cada molho de soja é diferente em termos dos componentes que o constituem, nomeadamente, compostos voláteis (ex: álcoois, ácidos orgânicos, ésteres e aldeídos), ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares [9,10].

Diferentes fontes de matérias-primas, diferentes processos de fabricação e estilo de fermentação utilizado (nomeadamente diferentes tempos e temperaturas de fermentação), assim como a utilização de diferentes microrganismos durante o processo, conduzem a diferentes componentes e atributos sensoriais para cada molho de soja [11].

Existem dois tipos diferentes de produção de molho de soja. Numa primeira opção a fermentação é realizada por microrganismos, sendo que como alternativa pode ocorrer uma fermentação química. Numa fermentação química, ocorre a produção de substâncias químicas que utilizam ácido para digerir proteínas e hidratos de carbono presente nos grãos de soja [12]. No entanto o molho de soja, resultante da fermentação química possui um sabor menos atrativo, devido à ausência de substâncias aromáticas como ésteres, álcoois e compostos carboxílicos que são derivados do processo de fermentação obtida por microorganismos [8].

1.1.1. Adulteração de molho de soja chinês

No decorrer do ano 2003, surgiu na China, um produto vendido sob o nome de "Hong Shuai", um molho de soja obtido por fermentação química e rotulado como "derivado da mais recente tecnologia de bioengenharia". Em Janeiro de 2004, o *Chinese Central Television (CCTV)* expôs a metodologia adotada na produção deste molho de soja. Este molho, era produzido a partir de um "xarope de aminoácidos" misturado com hidróxido de sódio, ácido clorídrico e outros produtos químicos.

Investigações e inspeções, realizadas posteriormente, no local de fabrico, revelaram que o "xarope de aminoácidos" era obtido pela extração de cabelo humano recolhido em salões de beleza, barbeiros e hospitais. Segundo os relatos obtidos pela equipa de reportagem, o cabelo humano era filtrado pelos trabalhadores, sendo posteriormente transformado num "xarope de L-Cisteína", sendo numa última etapa adicionados produtos químicos de modo a aumentar as propriedades sensoriais (sabor e textura) do produto.

A L-Cisteína é produzida naturalmente pelo corpo humano sendo responsável por fortalecer e estabilizar as ligações entre proteínas. Para além disso, este aminoácido possui propriedades antioxidantes [13]. No corpo humano, este aminoácido está presente, no cabelo a uma concentração elevada (14%) [14]. A L-Cisteína, também pode ser utilizada como agente redutor na indústria da panificação [15],[16].

Na realidade, toda a restante informação encontrada relativamente a produção deste "revolucionário molho de soja" é de origem duvidosa ("mitos urbanos"). As conclusões produzidas pelo segmento televisivo emitido pelo *CCTV*, parecem não ser baseadas em testes laboratoriais. Para além disso, a reportagem é realizada em apenas uma única fábrica podendo tratar-se assim de um caso individual e não derivado de uma situação generalizada, conforme mencionado e difundido pela *internet* [17].

De acordo com literatura, em Julho de 2012, as entidades reguladoras chinesas encerraram cerca 180 negócios da indústria alimentar, e segundo os autores registou-se a presença de molho de soja chinês apartir de cabelo, no entanto não referenciam o número de casos, nem afirmam que a soja foi produzida apartir de cabelo humano[2]. Contudo, se este incidente alimentar for verídico, podemos dizer que estamos perante um caso de fraude alimentar por substituição não declarada, em que a fonte proteica é substituída por outra de origem mais barata [18].

Apesar da falta de evidências, é importante ter em conta que quando existe o recurso a adulteração proteica, recorre-se a um adulterante não tóxico para os consumidores, que esteja disponível em grandes quantidades e que seja rentável, resultando numa diminuição do custo do produto alimentar para os consumidores e aumento do lucro para os adulteradores [4]. É igualmente importante referir, que o

cabelo é uma matriz biológica capaz de “armazenar” substâncias tóxicas e/ou substâncias de abuso [19].

1.2. O Consumo de Substâncias de Abuso na China

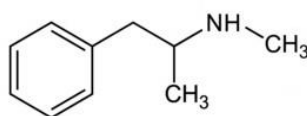
De acordo com o *China National Narcotics Control Commission*, as substâncias de abuso mais consumidas pela população chinesa, são a heroína, a ketamina, a metanfetamina, o MDMA (mais conhecido como “ecstasy”), o THC (composto ativo das plantas *Cannabis*) e a cocaína [20, 21].

A Ketamina, denominada de “pó K” na China, é um anestésico de ação rápida utilizada em animais e seres humanos. Esta substância, é igualmente alucinogénica produzindo sensações de euforia. Tendo em conta o seu efeito alucinogénico, esta substância de abuso tornou-se rapidamente popular nas denominadas “raves” [22].

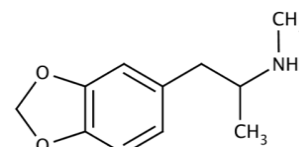
Por sua vez, a metanfetamina e o ecstasy ganharam popularidade na China, representando um enorme problema para as médias-grandes cidades. De acordo com estudos realizados, estima-se que na China, estes dois compostos sejam a primeira droga experimentada por novos usuários de substâncias de abuso. Por esse motivo, e atendendo que estes compostos são sintéticos, a China precisa de se concentrar em melhorar os controlos adotados sobre a produção doméstica de drogas sintéticas [21].



Ketamina



Metanfetamina



MDMA/Ecstasy

Figura 1.1. – Estrutura química da Ketamina, Metanfetamina e MDMA (Ecstasy).

1.3. Técnicas de Preparação de Amostras – Extração em Fase Sólida (SPE)

O principal objetivo nas técnicas de preparação de amostra é concentrar os analitos de interesse presentes na amostra e remover possíveis interferentes, melhorando a sensibilidade durante a análise instrumental, de modo a obter um resultado preciso [23].

Inicialmente, as técnicas de preparação de amostra eram baseadas em processos de extração com recursos a solventes orgânicos (como por exemplo a extração líquido-líquido, LLE) e a destilações. No entanto estas metodologias recorrem a grandes quantidades de solventes orgânicos. Neste sentido, têm sido desenvolvidas vários métodos de preparação de amostra alternativos, baseados nos princípios da “química verde”, como por exemplo a extração em fase sólida (SPE). A técnica de extração SPE tem várias vantagens, quando comparada com a LLE, das quais se destacam: diminuição da quantidade de solvente dispendida, melhor seletividade e especificidade, maior reprodutibilidade, melhor capacidade de remover possíveis interferentes, possibilidade de automatização, boa sensibilidade analítica, etc [23].

A SPE surgiu como um método de preparação de amostras rápido, que consiste na adsorção seletiva do analito em materiais sólidos, designados de adsorventes, e na sua posterior desadsorção efetuada com solventes orgânicos [24].

Os dispositivos SPE comerciais, foram introduzidos pela primeira vez, na década de 70, e desde então foi aceite pela comunidade científica, substituindo a extração líquido-líquido (LLE) como técnica de preparação de amostras. Atualmente, existe uma gama variada de adsorventes disponíveis no mercado, dos quais se destacam os polímeros de fase reversa, como o HLB. Os materiais adsorventes encontram-se, normalmente num cartucho de coluna aberta de polipropileno ou de vidro, empacotado entre dois discos de polietileno, aço inoxidável ou titânio [25].

Os cartuchos disponíveis, atualmente no mercado, podem ser usados em dois modos alternativos: i) os elementos interferentes na matriz são retidos na fase adsorvente do cartucho, enquanto os analitos alvo são eluídos; ii) os analitos alvo são retidos no cartucho SPE, enquanto os interferentes de matriz são eluídos em primeiro lugar [25].

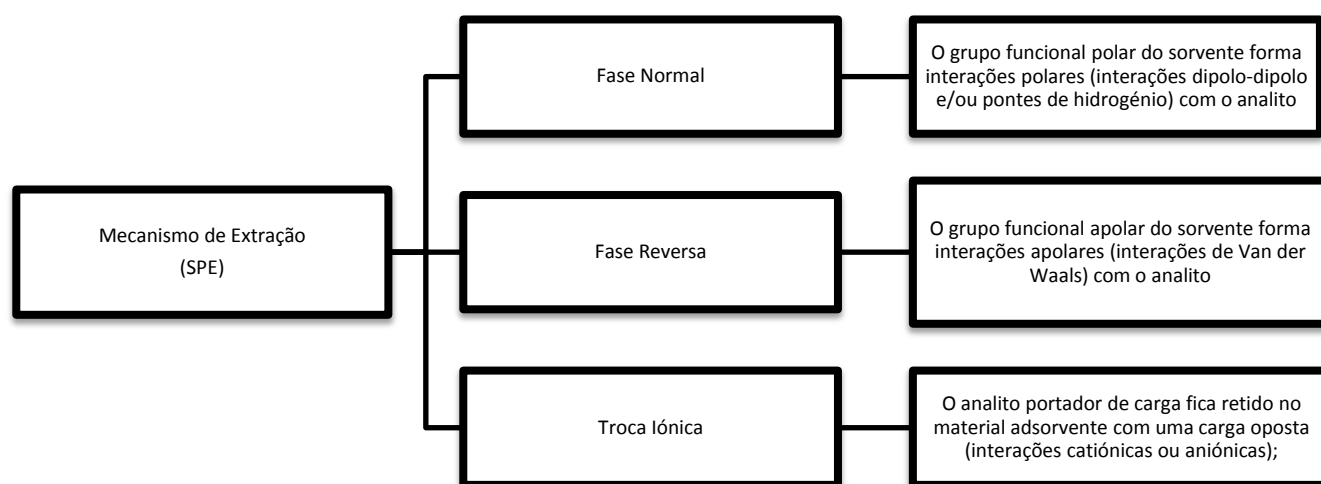


Figura 1.2. – Diferentes mecanismos de extração utilizados em SPE [23, 25].

A extração em fase sólida (SPE), tendo em consideração o mecanismo pelo qual os analitos ficam retidos no material adsorvente, pode ser classificada como sendo de fase normal, fase reversa ou por um mecanismo de troca iónica (figura 1.2). O mecanismo de fase reversa é o mecanismo mais utilizado na análise vestigial de resíduos tóxicos e de fármacos.

De uma forma geral, o procedimento de extração em fase sólida (SPE) envolve quatro etapas típicas [23, 25, 26]:

- i) Numa primeira etapa ocorre o condicionamento da fase adsorvente contida no cartucho SPE, utilizando-se volumes de solvente orgânico definidos (figura 1.3 A);
- ii) Posteriormente ocorre a aplicação da amostra no cartucho SPE (figura 1.3 B);
- iii) Por vezes, em grande parte das metodologias de SPE, utiliza-se um volume definido de solvente de modo a remover alguns interferentes de matriz que possam existir, posteriormente o cartucho é deixado a seco durante um período de tempo pré-determinado (figura 1.3 C);
- iv) Na última etapa ocorre a eluição dos analitos, com o recurso a quantidades de solvente definidas (figura 1.3 D).

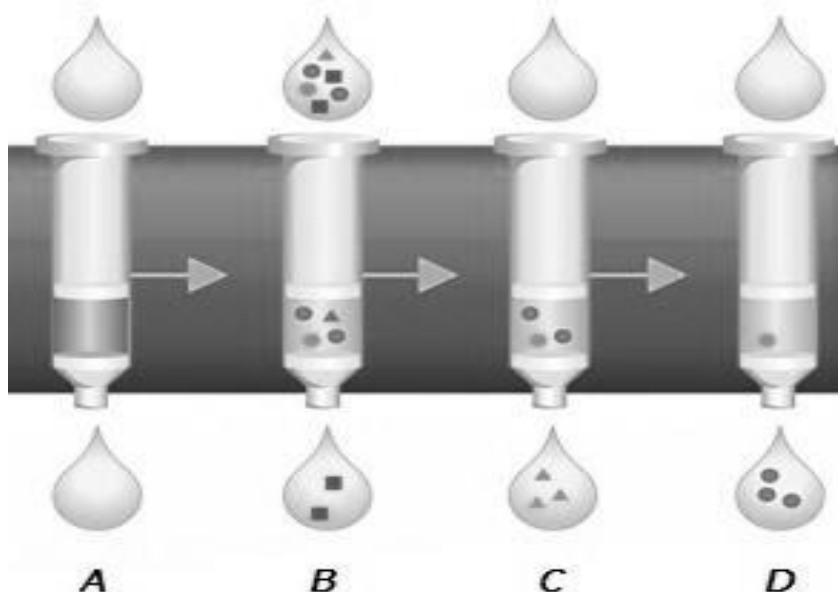


Figura 1.3 – Etapas de um procedimento SPE (*A*- Condicionamento; *B*- Aplicação da amostra; *C*- Lavagem; *D*- Eluição dos analitos alvo).

1.4. Técnicas Cromatográficas

De uma forma geral, a cromatografia engloba um conjunto de métodos físico-químicos que permite a separação dos componentes de uma mistura, através da sua distribuição entre duas fases, uma das quais é fixa (fase estacionária) enquanto a outra se move (fase móvel) numa determinada direção. Assim, os analitos presentes numa mistura são separados pelas diferenças de velocidade de arrastamento na fase móvel, originadas pelas diferentes interações que cada componente da mistura tem com a fase estacionária, promovendo distribuições diferenciadas no equilíbrio entre as fases [27,28].

A separação dos componentes de uma mistura, em cromatografia, encontra-se para além de outros fatores experimentais, dependente das fases móvel e estacionária envolvidas no processo de separação. Assim, para um componente de uma mistura, podemos falar em coeficiente de distribuição entre as duas fases (K), representado como a razão entre a concentração do componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) [27].

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

Um analito com um valor de K elevado irá mover-se mais lentamente ao longo da coluna, uma vez que tem maior afinidade com a fase estacionária, resultando na separação deste com os componentes que tem maior afinidade com a fase móvel (valor de K menor). Para que ocorra separação, dois componentes de uma mistura tem que existir diferenças na sua distribuição [22, 23, 27].

Quando se recorre a uma técnica cromatográfica o objetivo principal é que todos os componentes de uma dada mistura sejam separados. Assim a medida de separação entre dois componentes de uma mistura é designada por resolução (R_S), podendo ser calculada pela seguinte equação:

$$R_S = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_B}{(k'_B + 1)} \right)$$

A resolução (R_S), encontra-se dependente de 3 fatores fundamentais: a seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N) - para ocorrer resolução, o seu valor deverá ser igual ou superior a 1,5. A figura 1.4, ilustra a separação cromatográfica de dois componentes (A e B) de uma mistura, e pretende ilustrar os termos de seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N) [27].

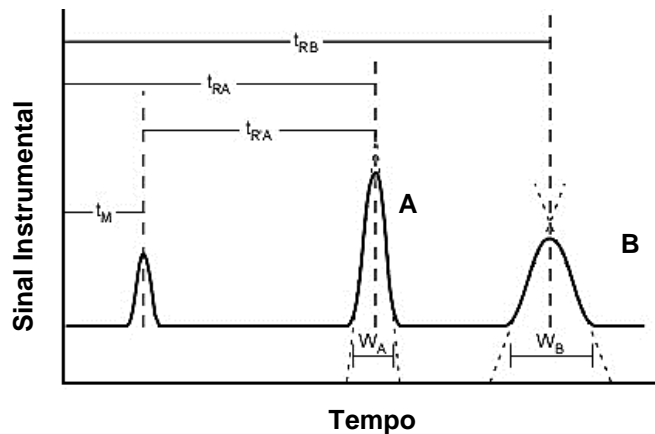


Figura 1.4 – Separação cromatográfica de uma mistura (A e B) e respectivos parâmetros de retenção [27].

O fator de capacidade (k'), é uma medida do grau de retenção que um determinado composto adquire quando sujeito a uma técnica cromatográfica. Quando um composto não é retido, pela fase estacionária, este será eluído no tempo morto (t_M). Por outro lado, quando um composto é retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção (t_R) superior, sendo o tempo de retenção ajustado (t_R') o tempo que o composto despende na fase estacionária. Assim, a equação que elucida o fator de capacidade, pode ser descrita como:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Por sua vez, o fator de seletividade (α) exprime o grau de separação entre dois componentes adjacentes de uma mistura, e ocorre quando o seu valor é superior a 1 [27]. Este parâmetro, encontra-se relacionado com a fase estacionária e com as condições operacionais, e pode ser traduzido pela razão dos fatores de capacidade dos dois componentes (A e B) [27].

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

A eficiência da técnica cromatográfica, pode ser expressamente associada a eficiência da coluna cromatográfica. A eficiência da coluna é expressa, através de um termo associado ao conceito de destilação fracionada – o número de pratos teóricos. Neste sentido, o número de pratos teóricos (N), é considerado uma grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação [27], sendo tanto maior quanto maior for N, e que pode ser calculada pela equação:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

1.4.1. Cromatografia em fase líquida (LC)

Os métodos cromatográficos podem ser classificados quanto a natureza física da fase móvel. Quando se utiliza um líquido como fase móvel, denominamos a técnica de cromatografia líquida (LC) [28].

A LC utiliza partículas sólidas empacotadas num tubo constituído por um material inerte (coluna cromatográfica) que é atravessado pela fase móvel líquida. Na realidade, a LC é uma técnica mais versátil do que a cromatografia gasosa (GC), uma vez que não se restringe somente a análise de compostos voláteis e semivoláteis [30].

De uma forma geral, o solvente denominado de eluente é conduzido, por ação de uma bomba, em direção à coluna cromatográfica. No decorrer desse processo, a amostra é introduzida no eluente, através de um sistema de válvulas de injeção (automatizado ou manual), e arrastada para a coluna onde irá ocorrer a separação.

No caso da GC, os compostos são retidos apenas por processos de partição ou de adsorção. No entanto, a cromatografia líquida permite que os compostos alvo possam ser retidos na coluna por outros processos, nomeadamente por exclusão molecular, troca iónica ou bio-afinidade. Assim, com recurso a LC podem-se separar os compostos de interesse, utilizando processos diferentes num mesmo equipamento, mudando apenas a fase estacionária (coluna) [27, 28].

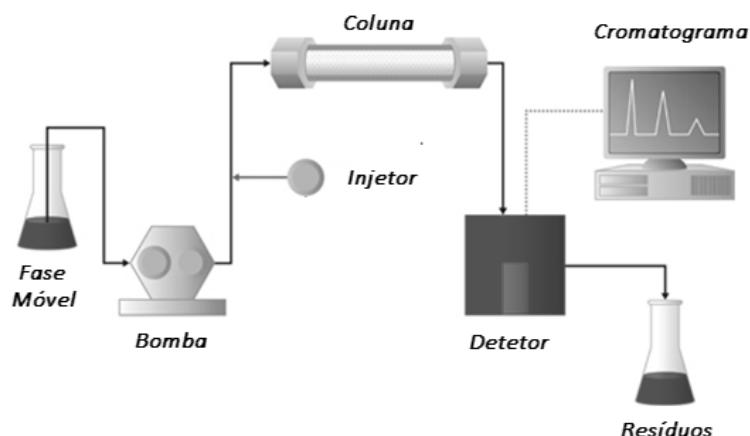


Figura 1.5 – Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida (LC).

Os compostos separados na coluna cromatográfica são posteriormente detetados por um detetor adequado, como por exemplo: UV-vísivel (UV-VIS), índice de refração (RID), fluorescência (FLD), condutividade (ELCD), eletroquímico (ELD) e de espectrometria de massa (MS) [28].

1.4.2. A cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa *Tandem* (LC-MS/MS)

A técnica de espectrometria de massa surge, geralmente associada a sistemas de cromatografia. Este acoplamento permite combinar o melhor de dois mundos, nomeadamente a elevada seletividade e eficiência de separação (associadas à cromatografia) com a capacidade de fornecer informação estrutural e massa molecular (inerentes à MS).

Ao contrário do equipamento de GC, a LC requer interfaces mais sofisticadas para ser acoplado a MS. A interface /fonte de ionização é utilizada para facilitar a transferência dos compostos a partir da coluna LC para o sistema MS e, simultaneamente, provocar a ionização dos compostos [31].

No caso da GC, as fontes de ionização com base na eletroionização (EI) e química (CI) foram empregues com sucesso no acoplamento a espectrometria de massa. No entanto, no caso do LC, tendo em consideração que a fase móvel é líquida, estas

interfaces/fontes de ionização demonstraram, no passado, problemas na detecção de compostos presentes em baixas concentrações [31].

O acoplamento de LC-MS foi entretanto melhorado, graças aos avanços da tecnologia que proporcionou o desenvolvimento de novas fontes de ionização/interface, que facilitaram o acoplamento destas duas técnicas, destacando-se a ionização por *electrospray* (ESI) [32]. Esta fonte de ionização, envolve a produção de iões através da formação de um *spray* sob um campo elétrico. O ESI, cria gotículas carregadas através de um processo de nebulização, sendo o solvente removido a medida que as gotículas entram no espectrómetro de massa. A ionização pode ocorrer em modo positivo ou negativo [28].

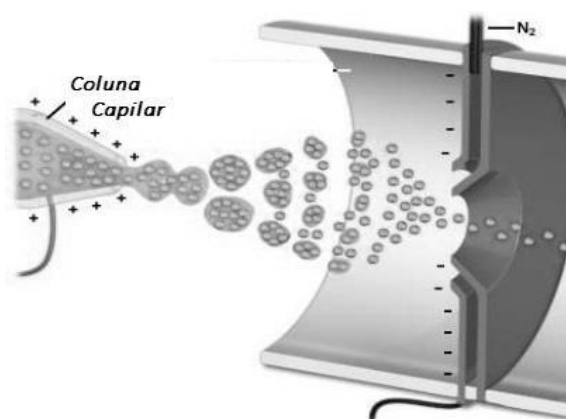


Figura 1.6 – Exemplo ilustrativo da ionização por *electrospray* (ESI).

Uma fonte de ionização ESI é particularmente adequada para compostos orgânicos polares termicamente lábeis que não podem ser analisados por GC-MS. No entanto, um dos inconvenientes em trabalhar com este tipo de interface consiste na possibilidade de ocorrer supressão ou aumento da formação iónica, devido a competição dos diferentes analitos e interferentes de matriz durante o processo de ionização, fenómeno conhecido por “supressão de iões” [33, 34].

Os desenvolvimentos tecnológicos conduziram igualmente ao aparecimento de novos analisadores de massa, como por exemplo: o tempo de voo (TOF) e o triplo-quadrupolo (QqQ). Ambos os analisadores são bastante utilizados no campo da

toxicologia forense e na análise alimentar. O detetor de tempo de voo (TOF) alcança uma boa resolução para diferentes compostos, embora o triplo quadrupolo tenha uma maior linearidade, seletividade e versatilidade [28].

O detetor triplo quadrupolo é considerado uma técnica de espectrometria de massa sequencial (MS/MS), uma vez que recorre a dois analisadores de massa quadrupolo (Q1 e Q3), separados por uma célula de colisão (Q2). A Figura 1.7, ilustra um equipamento, cujo analisador de massa é um triplo quadrupolo (QqQ).

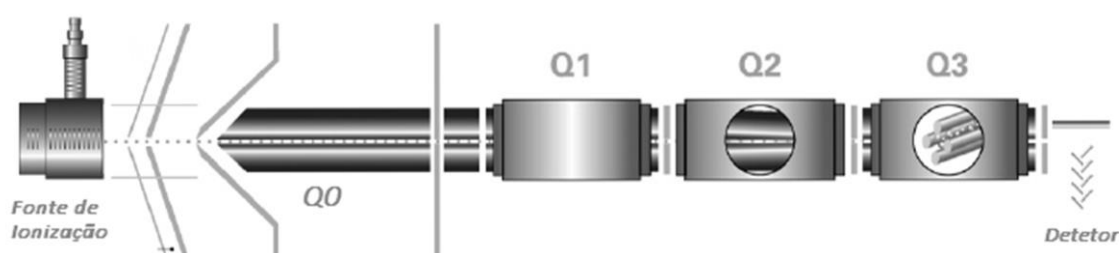


Figura 1.7 – Analisador de massa triplo quadrupolo (MS/MS).

No primeiro quadrupolo (Q1), o ião precursor é seleccionado de acordo com o seu rácio m/z . Esse ião é posteriormente, encaminhado para uma célula de colisão (Q2) onde sofre fragmentação, tipicamente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (árgon). Os iões gerados são direccionados para o segundo quadrupolo (Q3) onde ocorre o varrimento das massas para a obtenção do espectro de massas.

Quando se realizam análises quantitativas dos analitos de interesse em matrizes complexas, com recurso a um LC-MS/MS(QqQ) é comum utilizar o modo de aquisição MRM – *Multiple Reaction Monitorization*. Neste modo, ambos os dois quadrupolos operam no seu modo mais sensível. Neste modo de aquisição, o primeiro quadrupolo (Q1) está configurado para seleccionar um ião precursor com uma massa específica (m/z). Após a fragmentação, a uma energia de colisão otimizada, o segundo quadrupolo pode ser configurado para seleccionar um ou mais iões fragmentos resultantes do ião precursor.

A LC-MS/MS(MRM) é das técnicas hifenadas mais comuns para a análise de compostos em matrizes alimentares, pois oferece alta sensibilidade, seletividade e especificidade para a identificação de compostos inerentes aos conceitos de segurança e higiene alimentar [35].

1.5. Controlo de Qualidade em Molho de Soja Chinês

Tendo em consideração a variabilidade dos componentes presentes no molho de soja, testar a qualidade deste tipo de produto através de um método analítico, não é uma tarefa fácil. A qualidade do molho de soja foi estudada anteriormente com recurso a espectroscopia infravermelho (NIR) e por GC-MS.

A NIR tem como principal vantagem ser uma técnica não destrutiva e sem recurso a uma preparação de amostra complexa, contudo esta técnica apenas fornece informações baseada nas interações moleculares, não necessariamente informações específicas dos compostos presentes. No entanto, a técnica NIR, é uma técnica interessante para obtenção de resultados rápidos e precisos na determinação da adulteração de molho de soja [12].

Na literatura, também é possível verificar que a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) pode ser vantajosa para a análise de compostos voláteis/semivoláteis presentes em molho de soja, contribuído para a sua caracterização e possível identificação de uma adulteração, contudo esta técnica requiere o recurso a uma preparação de amostra *à priori* [36].

A LC-MS/MS é utilizada para a determinação de aminoácidos e outros compostos orgânicos específicos em molho de soja [37].

1.6. Objetivos

O presente trabalho foi realizado durante um estágio no laboratório de preparação de amostras do *Dipartimento di Chimica e Farmacia - Università degli Studi di Sassari* (Itália). O período de estágio teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento novas metodologias analíticas para a detecção de substâncias de abuso, aditivos e/ou substâncias psicoativas.

Durante o período de estágio, pretendeu-se desenvolver uma metodologia analítica alternativa, SPE/LC-MS/MS, para a detecção e quantificação de substâncias de abuso (ketamina, MDMA e metanfetamina) em molho de soja.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, Materiais e Amostras

Os padrões Ketamina, MDMA e Metamfetamina (100 µg/mL) foram adquiridos à LC Standards (Reino Unido). Os padrões internos dos analitos deuterados Ketamina-D4, MDMA-D5 e Metamfetamina-D5 (100 µg/mL) foram adquiridos à LC Standards (Reino Unido).

O acetato de etilo e a acetona foram fornecidos pela Sigma-Aldrich® (Alemanha). A solução de amônia (30%) foi adquirida à Carlo Erba Reagents (Ítalia). A água ultra-pura foi obtida através do sistema Milli-Q RG Ultra-Pure Water System da Millipore Corporation (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). As fases móveis acetonitrilo e o aditivo ácido fórmico, de qualidade LC, foram adquiridos à Sigma-Aldrich® (Alemanha). Os cartuchos de SPE Supel™-Select HLB SPE Tube 30 mg foram adquiridos à Sigma-Aldrich®.

Para a realização deste trabalho prático, foram necessários materiais comuns de laboratório. Foram utilizadas uma micropipeta 100 µL e uma micropipeta 1000 µL (Lab Solutions HTL).

2.2. Instrumentação

As análises foram realizadas, utilizando um sistema LC-20AD_{XR} (Shimadzu® Itália, Milão), acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 2000 Applied Biosystem MDS Sciex (Concord, Ontario, Canada). A aquisição de dados foi realizada utilizando a versão do software da Applied Biosystem Analyst 1.6, sendo a quantificação realizada utilizando o software Applied Biosystem MultiQuant (versão 2.1.).



Figura 2.1 – Sistema LC-MS/MS, utilizado para a realização do trabalho experimental.

Durante a elaboração do trabalho, recorreu-se a uma balança analítica Gibertini E42S-B (Itália), um medidor de pH Hanna Instruments, concentrador de amostras com sistema em fluxo de gás inerte (nitrogénio) da Techne (Reino Unido) e um sistema de suporte para 12 cartuchos SPE com sistema de vácuo Visiprep™.

2.3. Método Experimental

2.3.1. Otimização das condições MS/MS

A detecção MS foi realizada com um espectrómetro de massa triplo quadrupolo (QqQ) equipado com uma interface de ionização por *electrospray* (ESI) - Applied Biosystem MDS Sciex Aplicada (Concord, Ontário, Canadá) API 2000. Os analitos e respectivos padrões internos foram injetados a uma concentração de 10 µg/mL (separadamente), em modo negativo e em modo positivo de modo a otimizar os parâmetros de ionização. Uma vez que as intensidades de sinal foram mais significativas utilizando o modo positivo, os espectros de massa foram adquiridos neste modo de operação. Os espectros de massa revelaram picos intensos para os iões moleculares $[M+H]^+$ de cada analito, sendo estes, seleccionados como ião precursor.

Após a seleção dos iões precursores, foram seleccionados os fragmentos iónicos a monitorizar para cada analito. Foi utilizado modo MRM, tendo sido seleccionadas duas transições: uma transição foi seleccionada, com o intuito de funcionar como uma transição de confirmação e uma com o intuito de ser utilizada como uma transição para quantificação.

A temperatura da fonte iónica foi de 400 ° C. A tensão de pulverização iónica foi de 5000 V, a cortina de gás nebulizante e o gás de colisão foram fixadas em 6 unidades arbitrárias. Os parâmetros otimizados MS/MS são relatados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Parâmetros otimizados das condições MS/MS.

Substância de Abuso	Ião Precursor (m/z)	DP (Declustering Potential) ¹	Fragmentos Iônicos (m/z)	Energia de Colisão (eV) ²	CXP (Collision Cell Exit Potential) ³
Ketamina	238,2	26	125,2*	39	6
			89,2	77	4
Ketamina-D4	242,2	31	129,1	39	22
MDMA	194,2	21	105,2	33	16
			163,2*	17	10
MDMA-D5	199,2	21	165,2	19	8
Metanfetamina	150,2	16	119,2*	15	6
			91,2	27	14
Metanetamina-D5	155,3	31	121,3	15	20

* Fragmento iônico utilizado como transição de quantificação;

“Entrance Potential” (EP): 10 V; “Focusing Potential” (FP): 200 V

¹DP (Voltagem do cone): Potencial aplicado no orifício de entrada dos íons no MS/MS; ²CE: Potencial aplicado para guiar os íons e direcioná-los para o MS/MS; ³CXP: Potencial aplicado para guiar os íons e acelera-los para o Q3;

2.3.2. Condições Experimentais (LC)

A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna Kinetex C18 (50x2,1 milímetros, 2,6 µm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) equipado com pré-coluna C18 de 2,1 milímetros (Phenomenex). O volume de amostra injetado no sistema de LC-MS/MS, foi de 5 µL no sistema de LC-MS/MS.

Foi utilizado um gradiente de eluição com recurso a um gradiente de eluição: (A) 0,1 % de ácido fórmico em água e (B) 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrilo. O programa do gradiente de eluição utilizado foi: 0 min - B:A (10:90, v:v) ; 4 min – B:A (95:5; v:v) ; 6 min – B:A (95:5; v:v) ; 10 min – (10:90; v:v). A taxa de fluxo de foi de 0,3 ml / min. O tempo de corrida da separação cromatográfica foi de 10 minutos.

2.3.3. Critérios utilizados para análise qualitativa e metodologia quantitativa dos analitos alvo

A análise qualitativa foi realizada de acordo com as transições de MRM selecionadas e tempos de retenção obtidos pela separação cromatográfica, nas condições descritas anteriormente. A identificação positiva de analito em amostras foi realizada atendendo que a diferença entre o tempo de retenção obtido na amostra não poderia ultrapassar a diferença de 0,20 minutos em comparação com o tempo médio de retenção dos padrões de referência.

Tendo em consideração que duas transições por cada analito foram selecionadas, foi igualmente considerada a razão das duas transições (qualificadora e quantificadora), como critério qualitativo. A razão entre as duas transições não poderá apresentar uma diferença superior a 30% da média obtida durante o processo de validação (curva de calibração).

O método de “adição de padrão interno” foi escolhido como a metodologia a adotar para a quantificação. A abordagem da adição do padrão interno baseia-se numa comparação das respostas relativas do analito para a resposta de um determinado composto (padrões interno) adicionado a cada uma das amostras e calibradores [1]. Neste tipo de metodologia, os cálculos para a quantificação dos compostos é baseado na resposta relativa do analito ao seu correspondente padrão interno.

De uma forma geral, a curva de calibração gerada utilizando a metodologia do padrão interno é calculada através da representação gráfica (SA/SIS) versus (CA/CIS). Sendo, SA e SIS os sinais instrumentais (área do pico) do analito e do padrão interno respetivamente; e CA e CIS as concentrações de analito e o padrão interno, respetivamente.

A metodologia da adição padrão interno permite uma maior precisão no que refere a quantificação dos analitos e assegura eventuais perdas causadas pelo processamento de amostra, uma vez que o padrão interno sofre o mesmo tratamento e preparo de amostra que o analito alvo. O padrão interno deverá, idealmente, ter propriedades semelhantes às do analito de interesse[2] assim, no presente trabalho os

substâncias deuteradas Ketamina-D4, MDMA-D5 e Metamfetamina-D5 foram escolhidos, como padrões internos.

2.4. Metodologia de Extração

A metodologia de extração adotada no presente trabalho, foi baseada numa metodologia previamente descrita na literatura [3], com pequenas alterações.

O processo de extração foi realizado num sistema de suporte para 12 cartucho, simultaneamente, sob sistema de vácuo. Cada cartucho SPE Supel™-Select HLB foi pré-condicionado, utilizando 5 mL de acetato de etilo, 5 mL de acetona e 5 mL de água ultrapura. Após a pré-condicionamento do cartucho, foi eluído 5 mL de molho de soja com pH ajustado de 8,5. O cartucho de SPE foi posteriormente lavado com 2 mL de água e portado a seco.

Após a secagem do sorvente (5 min), os analitos alvo foram eluídos usando 2 mL de acetato de etilo e 8 mL de acetona, por esta ordem específica. Após o processo de eluição, os extratos foram evaporados, utilizando um concentrador de amostra com sistema de nitrogénio. Antes da análise LC-MS/MS, 1 mL de fase móvel foi adicionado ao vial.

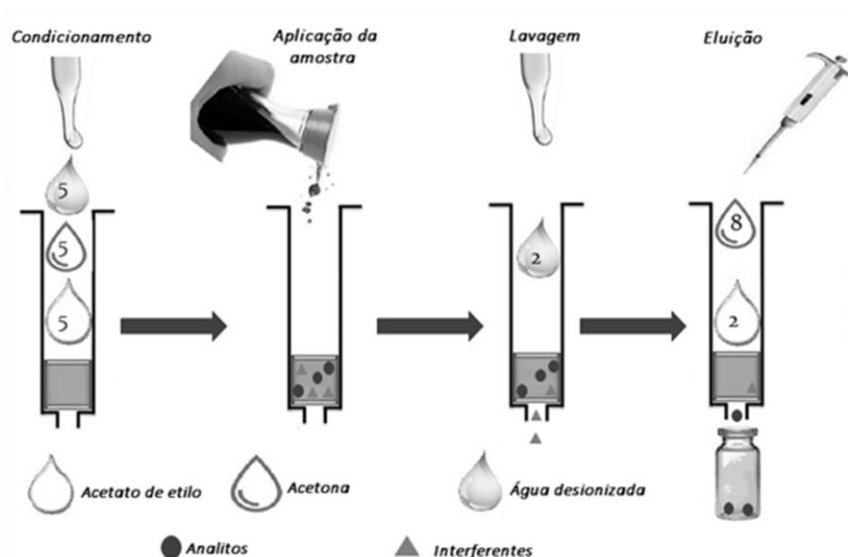


Figura 2.2 – Metodologia SPE adotada no presente trabalho.

2.5. Validação

Para os estudos de validação do método, efetuaram-se ensaios com diferentes níveis de fortificação (10-400 µg/L). A metodologia usada é discutida na secção 3 (Resultados e Discussão), para cada parâmetro. Os parâmetros estudados foram: limiares analíticos (limite de deteção e de quantificação), curva de calibração e linearidade, efeito matriz, seletividade, recuperação, repetibilidade e precisão intermédia.

O efeito matriz foi calculado utilizando a equação:

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{[\text{Razão Analito-IS Restituído}] - [\text{Razão Analito - IS de Referência}]}{\text{Razão Analito - IS Referência}} \times 100$$

2.6. Análise de Amostras Reais

A metodologia desenvolvida foi aplicada a 17 amostras reais. As amostras foram adquiridas em lojas de produtos alimentares importados da China, sendo posteriormente colocadas em frascos de amostragem (20 mL) e armazenadas a uma temperatura ambiente até a análise.

Cerca de 5 mL foram recolhidas utilizando uma micropipeta 100uL e procedeu-se ao ajustamento do valor de pH para um valor de 8,5, utilizando uma solução de amónia (30 %). Após o ajustamento de pH, 5mL foram transferidos para um tubo de ensaio, sendo posteriormente adicionados 50 µL da mistura de padrão interno. Após a aplicação da metodologia de extração SPE descrito anteriormente, os extratos foram injetados no sistema LC-MS/MS para análise.

3. Resultados e Discussão

3.1. Limiares Analíticos do Método - Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A primeira etapa realizada consistiu em verificar os limiares analíticos associados à metodologia proposta. O limite de detecção (LOD) pode ser definido como a concentração mínima de analito que pode ser detectado pelo método desenvolvido, no entanto este valor não permite necessariamente a quantificação do analito alvo [1]. Em cromatografia, o LOD pode ser traduzido como a quantidade injetada de analito que produz um sinal instrumental, com uma altura, de pelo menos, duas ou três vezes, tão elevados quanto o nível da linha de base [2].

O limite de quantificação (LOQ) de um procedimento analítico é a quantidade mínima de analito presente na amostra, que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão [1].

Tendo em conta que o método desenvolvido propõe uma análise qualitativa e quantitativa, estes dois parâmetros foram estudados. De forma a obter os valores de LOD e de LOQ instrumentais, realizou-se diluições sucessivas de uma solução padrão (10 µg/mL) até se obter uma razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respetivamente.

Tabela 3.1. – Limiares analíticos obtidos para cada um dos analitos de interesse nas condições LC-MS/MS (MRM) utilizadas.

Substância de Abuso	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
<i>Ketamina</i>	0,3	1,3
<i>MDMA</i>	0,6	1,9
<i>Metanfetamina</i>	0,4	1,5

Tendo em consideração, que não é possível prever a concentração a que os analitos possam estar presente na matiz, no caso de esta ser produzida a partir de cabelo humano, torna-se difícil de afirmar se os limiares analíticos vão ao encontro do objetivo proposto pelo método desenvolvido. De modo a solucionar a questão, poderia ser

calculada uma concentração estimada, tendo como base a concentração média a que estes compostos são encontrados na matriz biológica. No entanto, a quantidade necessária de cabelo humano para produzir um molho de soja adulterado não é de todo indicado nas notícias publicadas.

3.2. Gama Linear Dinâmica

Durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica é necessário estudar a relação entre o sinal analítico em função da concentração dos analitos de interesse presentes na matriz, de modo a obter um resultado preciso, quando o método for aplicado a amostras reais. Assim, é necessário verificar se existe proporcionalidade entre o sinal instrumental obtido (através da metodologia SPE/LC-MS/MS) e a concentração dos analitos alvo, através da realização de uma curva de calibração.

Para este estudo, molho de soja comercial foi fortificado com 50 µL da mistura dos padrões internos e quantidades apropriadas dos analitos alvo em seis concentrações diferentes (10, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/L). Após, o processo de extração descrito anteriormente, os extratos foram analisados, nas condições previamente estabelecidas. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Coeficientes de determinação (r^2) e equação da reta ($Y=aX+b$) para cada um dos analitos de interesse (Ketamina, MDMA e Metanfetamina).

Substância de Abuso	Coeficiente de Determinação $r^2 \pm SD$	Equação da Reta $Y=aX + b$
<i>Ketamina</i>	$0,998 \pm 0,012$	$Y=2,27X-0,11$
<i>MDMA</i>	$0,999 \pm 0,019$	$Y=1,94X-0,03$
<i>Metanfetamina</i>	$0,997 \pm 0,009$	$Y=0,10X+0,12$

Tendo em consideração a tabela 3.2, podemos verificar que a metodologia usada apresenta boa linearidade para todos os analitos de interesse ($r^2 \geq 0,997$). O desvio observado, revela que o método tem grandes potencialidades na quantificação dos analitos ao longo da gama de trabalho estudada.

3.3. Efeito de Matriz

Tendo em consideração, que a metodologia analítica desenvolvida envolve a LC-MS/MS, é necessário verificar o efeito da matriz, como parâmetro de validação.

O efeito de matriz ocorre quando os compostos alvo co-eluem, alterando a eficiência da ionização por *electrospray* (ESI) [3]. O mecanismo exato, pelo qual se verificam os efeitos de matriz é desconhecido, mas provavelmente a sua origem encontra-se na competição entre os analitos e a co-eluição de componentes inerentes a matriz que não são monitorizados (indetetáveis) [4].

Dependendo do ambiente, em que o processo de evaporação e de ionização de iões tem lugar, esta competição pode reduzir a eficiência (vulgarmente conhecida como a supressão de iões) ou aumentar a eficiência de formação de iões do analito [5].

Para o trabalho realizado, o efeito matriz foi avaliado pela “fortificação após extração”, um das abordagens mais utilizadas [3]. Neste tipo de abordagem, os analitos são adicionados após o processo de extração (analitos restituídos) e comparados com o padrão referência para a mesma concentração.

Para estudar o efeito matriz, o molho de soja comercial foi extraído sem qualquer tipo de fortificação. Após o processo de extração, cada extrato foi fortificado com 50 µL da mistura de padrões internos (IS) e quantidades apropriadas dos analitos com interesse em três níveis de concentração diferentes (25, 200 e 400 µg/L). O ensaio foi realizado em triplicado, para cada nível de concentração. As proporções da razão do analito-IS obtida a partir dos extratos restituídos foram comparadas com a razão do analito-IS padrão. Os resultados relativamente a este parâmetro encontram-se descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Efeito matriz (%) para cada analito de interesse, a três níveis de concentração (25, 200, 400 µg/L).

Substância de Abuso	Concentração (µg/L)	Efeito Matriz (%)
<i>Ketamina</i>	25	-7,2
	200	-11,0
	400	-9,9
<i>MDMA</i>	25	-12,0
	200	-9,4
	400	-4,4
<i>Metanfetamina</i>	25	-8,6
	200	-8,7
	400	-8,1

Conforme se pode verificar, a metodologia adotada, não apresenta efeitos de matriz significativos ($\leq -12\%$), para nenhum dos analitos estudados, seja a um nível alto, médio ou de baixa concentração. Tendo em consideração os resultados obtidos, podemos concluir que todos os analitos, quando ionizados com a matriz, vão sofrer uma supressão de iões durante o processo de ionização.

No caso do MDMA, verifica-se claramente que este irá sofrer menor supressão a concentrações mais elevadas, sendo que no caso da ketamina e da metanfetamina foi o nível médio que aparentou sofrer menor supressão.

3.4. Seletividade

A seletividade do método pode ser descrita como a capacidade analítica para identificar/quantificar de forma inequívoca o analito em estudo. Em outras palavras, é a capacidade do método para avaliar de forma não ambígua o analito durante a análise da amostra. A seletividade é um parâmetro importante para o procedimento de validação, uma vez que permite distinguir e quantificar a resposta dos analitos a partir da resposta de outras substâncias de interferência, nomeadamente metabolitos, impurezas, componentes da matriz, etc [2].

No presente estudo, a seletividade foi avaliada através da comparação de cromatogramas provenientes três lotes diferentes de molhos de soja comerciais, que não sofreram fortificação, analisados em triplicado. Dos resultados obtidos, não foram detetados nenhuma substância interferente, nem diferenças significativas nos perfis cromatográficos obtidos, nem nos valores dos parâmetros monitorizados.

Apesar de o método apresentar seletividade é importante referir que apenas três lotes diferentes de molho de soja foram testados. De modo a complementar e a fornecer mais informações sobre este parâmetro, pelo menos mais três lotes de soja deveriam ter sido testados, tendo em consideração que a probabilidade de se detetar qualquer substância interferente é, somente reduzida quando é avaliada a partir da análise de 6 matrizes de diferentes procedências [4].

3.5. Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermédia

Por último, foi avaliada a recuperação, a repetibilidade e a precisão intermédia associadas à metodologia proposta. A repetibilidade foi avaliada a baixa, média e alta concentração (25, 200 e 400 µg/L), conforme se procedeu no estudo do efeito matriz. Por cada nível de concentração foram realizados cinco replicados, onde foi calculado o desvio-padrão relativo (RSD). Se esses replicados forem comparados com o padrão correspondente, obtêm-se a recuperação média para os três níveis de concentração.

A precisão intermédia foi obtida, através da realização de cinco replicados, ao longo de cinco dias consecutivos.

Tabela 3.4 – Recuperação média (%), repetibilidade (RSD) e precisão intermédia (RSD) obtidas no método desenvolvido para cada analito a três níveis de concentração diferentes (25, 200, 400 µg/L).

Substância de Abuso	Concentração (µg/L)	Recuperação		Precisão Intermédia
		Média (%)	Repetibilidade	
<i>Ketamina</i>	25,0	99,0	10,3	12,1
	200,0	99,0	11,5	13,3
	400,0	89,0	9,5	10,8
<i>MDMA</i>	25,0	91,0	11,6	10,0
	200,0	95,0	10,7	9,9
	400,0	94,0	9,4	8,5
<i>Metanfetamina</i>	25,0	90,0	8,8	13,1
	200,0	96,0	6,8	13,3
	400,0	98,0	10,2	11,2

De acordo com os resultados obtidos e descritos na tabela 3.4 podemos verificar que a metodologia de extração adotada permitiu excelentes valores de recuperação. O polímero HLB, tem sido bastante utilizado para a extração de substâncias de abuso em diferentes matrizes biológicas e ambientais (água residual), obtendo-se, geralmente boas recuperações.

Os valores de recuperação obtidos ($\geq 89\%$) podem indicar que os compostos apresentam pouca afinidade para a matriz alimentar. Os analitos vão interagir com a fase polimérica, através de interações de fase reversa, ficando retidos no cartucho SPE.

A repetibilidade e a precisão intermédia obtidas, revelam as boas capacidades da metodologia desenvolvida em termos quantitativos, uma vez que não se verificaram, desvios superiores a 11,6 % e 13,3 % em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, respetivamente, para os diferentes níveis de concentração estudados.

A figura 3.1 ilustra os cromatogramas de uma amostra fortificada para um nível médio de fortificação (200 µg/L), obtidos durante o processo de validação.

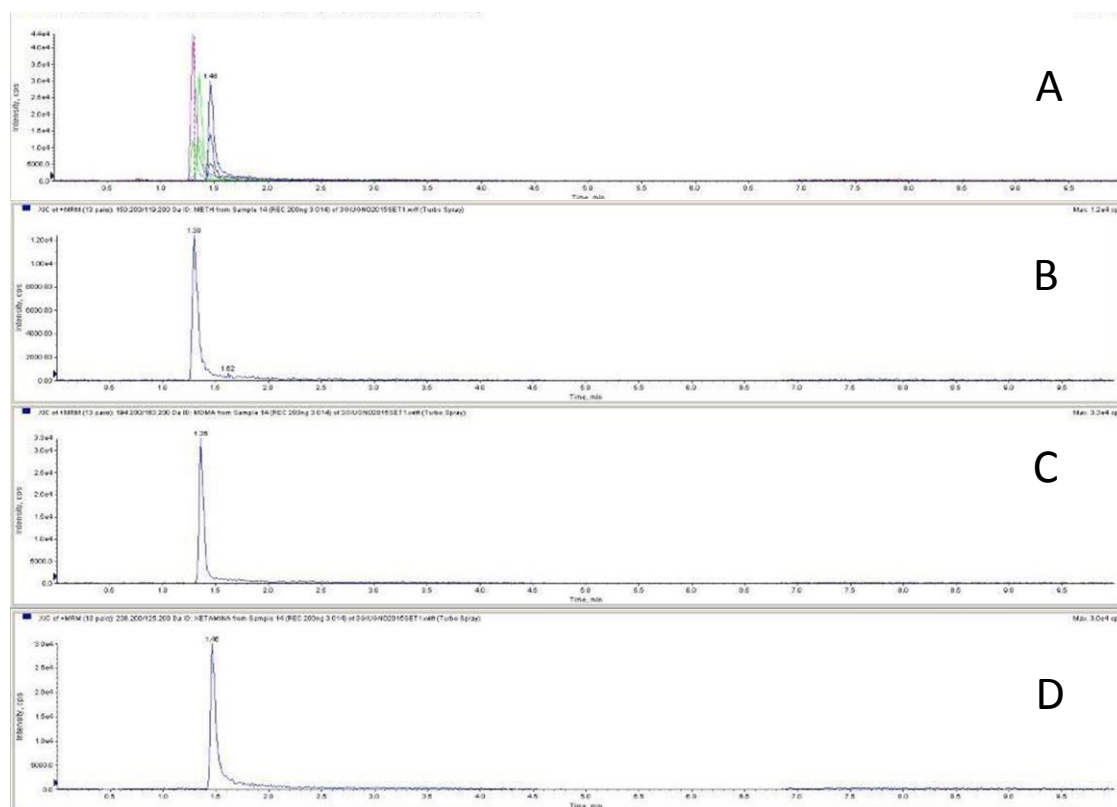


Figura 3.1. - Cromatogramas de uma amostra fortificada para um nível médio de fortificação (200 µg/L), onde: **A**= Cromatograma total; **B**= Cromatograma XIC da transição de quantificação da Metanfetamina (m/z 150/119); **C**= Cromatograma XIC da transição de quantificação do MDMA (m/z 194/163); **D**= Cromatograma XIC da transição de quantificação da Ketamina (m/z 238/125); Análise efetuada por SPE/LC-MS/MS(MRM).

3.6. Análise de Amostras Reais

A metodologia desenvolvida, foi aplicada a 17 amostras de soja suspeitas de adulteração, adquiridas em estabelecimentos comerciais direcionadas para produtos alimentares chineses. As amostras foram analisadas, em duplicado, não se tendo registado a presença dos analitos em estudo ($< LODs$). A figura 3.2 ilustra os cromatogramas obtidos da análise de uma amostra real adotando a metodologia SPE/LC-MS/MS(MRM) desenvolvida no presente trabalho.

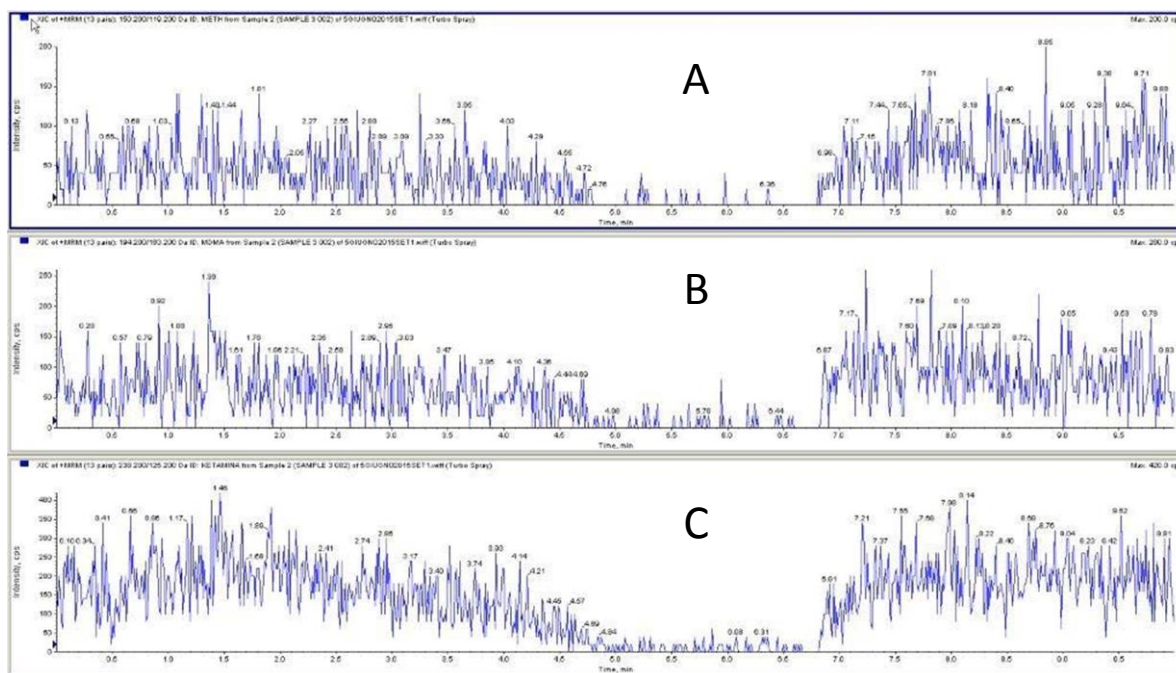


Figura 3.2 - Cromatogramas de uma amostra real (S2), onde: **A**= Cromatograma XIC da transição de quantificação da Metanfetamina (m/z 150/119); **B**= Cromatograma XIC da transição de quantificação do MDMA (m/z 194/163); **C**= Cromatograma XIC da transição de quantificação da Ketamina (m/z 238/125); Análise efetuada por SPE/LC-MS/MS(MRM).

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O presente trabalho propõe uma metodologia SPE/LC-MS/MS(MRM) para a determinação de ketamina, MDMA e metanfetamina em molho de soja, tendo em consideração que, a produção deste produto alimentar na China, pode advir da hidrólise de cabelo humano.

Numa primeira etapa, otimizou-se as condições de MS/MS por forma a permitir as condições ideais para a análise dos compostos em estudo. A otimização MS/MS(MRM) e as condições LC, permitiram analisar os compostos em tempo analítico adequado (10 minutos). Verificaram-se bons limiares analíticos para os três compostos em estudo, com LODs inferiores a 0,6 µg/L (MDMA) e LOQs inferiores a 1,9 µg/L (MDMA).

A metodologia de quantificação adotada para o trabalho foi a metodologia da adição de padrão interno, de modo a assegurar eventuais perdas durante as etapas de preparação da amostra. Os padrões internos selecionados foram os respetivos compostos em estudo na sua forma deuterada: ketamina-D4, MDMA-D5 e metanfetamina-D5.

A extração SPE foi executada recorrendo a um cartucho de fase reversa Supel™-Select HLB, tendo a sua eficiência sido testada para cada um dos analitos em três gamas de concentração diferentes (25, 200 e 400 µg/L), obtendo-se recuperações superiores a 89 %.

A validação do método teve em conta os limiares analíticos associados, gama de linearidade, efeitos de matriz, seletividade, repetibilidade e precisão intermédia. O método demonstrou excelente linearidade ($r^2 > 0,997$), para uma gama de trabalho compreendida entre 10,0 e 400,0 µg/L. O efeito matriz foi verificado com recurso a metodologia de “fortificação após extração”, realizado para três níveis de concentração (alta, média e baixa), tendo-se verificado supressão de iões durante a ionização por *electrospray* (ESI) em níveis aceitáveis (≤ -12 %) para os compostos em estudo. A análise de três lotes diferentes de molhos de soja comerciais, revelaram que a técnica apresenta seletividade, relativamente a componentes da matriz recomendando-se, no entanto, que numa perspetiva futura sejam utilizadas, pelo menos mais três matrizes de diferentes procedências ($n \geq 6$).

A repetibilidade e a precisão intermédia obtidas, revelaram boa eficiência da metodologia desenvolvida em termos quantitativos, uma vez não se terem verificado desvios superiores a 11,6 % e 13,3 % em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, respetivamente.

A metodologia SPE/LC-MS/MS(MRM) foi aplicada a 17 amostras de soja, adquiridas em estabelecimentos comerciais chineses, não tendo sido observadas a presença de ketamina, MDMA ou metanfetamina ($< LODs$). Apesar do bom desempenho da metodologia, importa referir o desconhecimento do nível de concentração em que estes compostos podem estar presentes neste tipo de matrizes.

Numa perspetiva futura, as amostras reais poderiam ser analisadas com o intuito de detetar a presença de *L-Cisteína*, recorrendo a outras técnicas analíticas. Seria igualmente benéfico optar por uma extração “mais amiga do ambiente”, uma vez que por cada ensaio é necessário o recurso a quantidades apreciáveis de solventes orgânicos.

PARTE II

*Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica
Alternativa para Despistagem de Novas Substâncias
Psicoativas em Saliva*

André Martins Segurado

Orientado por:

Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

In the last decade, there has been an uprising of new psychoactive substances (NPS) available in *smartshops* and over the Internet. NPS are “new narcotic or psychotropic drugs that are not listed in the Single Convention on Narcotic Drugs of 1961 or the Convention on Psychotropic Substances of 1971, but which may pose a public health threat comparable to that posed by substances listed in those conventions”. These compounds became a legal alternative to illicit drugs, such as cocaine, ecstasy or cannabis. Since 2005, more than 460 novel NPS have been monitored by the *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction (EMCDDA)* with more than 98 new substances being reported for the first time only in 2015, of which 26 are synthetic cathinones. These compounds are β -keto phenethylamines, the structural analogs of the natural occurring cathinone, the psychoactive stimulant found naturally in the *khat* plant.

The present work, proposes a new methodology, by combining bar adsorptive microextraction with gas chromatography coupled to mass spectrometry, BA μ E-LD/GC-MS(SIM), for the screening of three synthetic cathinones, in saliva. In a first approach, the behavior of a group of synthetic cathinones (methyldone, α -PVP, α -PVT, MDPVP, MDPBP and MDPV) was studied by GC-MS. Synthetic cathinones are thermolabile and can suffer degradation in the *liner*, during the injection in the GC-MS system, in which the conditions are critical. The use of deactivated *liners* inhibits the degradation for pyrrolidine cathinones. However, during the optimization of BA μ E methodology, it was concluded that the linearity of the compounds was affected along the time, due to degradation effects, proving that GC-MS presents low reproducibility for such compounds.

Taking into account the phenomenon related to the injection of synthetic cathinones into GC-MS equipment and, regarding that there was no conditions to develop a quantitative analysis, a screening method using *splitless* mode injection was carried out for α -PVP, α -PVT and MDPV, in saliva samples. The method allowed good resolution for the compounds presenting limits of detection of 100.0 μ g/L. The microextraction

methodology allow average recoveries of 43.1 (± 13.2), 63.7 (± 10.8) and 52.3 (± 13.6) for α -PVP, α -PVT and MDPV, respectively.

The methodology showed a good performance in terms of selectivity and ability to identify the three compounds in oral fluid, which is a noninvasive approach and can be collected in a simply and monitored manner, avoiding adulteration.

KEYWORDS:

New Psychoactive Substances

Synthetic Cathinones

Screening Analysis

Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E)

Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)

Oral Fluid

Durante a última década, observou-se o surgimento rápido de novas substâncias psicoativas (NPS) disponíveis em *smarthshops* e na internet. As NPS são "todas as substâncias estupefacientes ou psicotrópicas que não são controlados pela Convenção de 1961 (Lista de Estupefacientes) e pela Convenção de 1971 (Lista de Substâncias Psicotrópicas), mas que podem representar uma ameaça para a saúde pública". Estes compostos surgiram como alternativa legal às drogas ilegais, como a cocaína, o ecstasy ou a cannabis. De acordo com o *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction* (EMCDDA), desde 2005 surgiram mais de 460 novas NPS, sendo que das 98 reportadas, pela primeira vez em 2015, 26 são catinonas sintéticas. Estes compostos são β -keta-feniletilaminas, estruturas análogas a catinona, uma substância psicoativa encontrada na folha de *khat*.

O presente trabalho, propõe uma nova metodologia, recorrendo a microextração adsorptiva em barra combinada com a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, BA μ E-LD/GC-MS(SIM) para a despistagem de três catinonas sintéticas, em saliva. Numa primeira fase, o comportamento químico de diferentes catinonas sintéticas (metilona, α -PVP, α -PVT, MDPPP, MDPBP e MDPV) foi estudado por GC-MS. As catinonas sintéticas são compostos termolábeis e podem sofrer degradação no *liner*, durante a injeção no sistema GC-MS, sendo as condições críticas. A inibição do produto de degradação, no caso das catinonas pirrolidinas, pode ser alcançada com recurso a utilização de *liners* desativados. No entanto, durante a otimização da metodologia BA μ E concluiu-se, que a linearidade dos analitos é afetada ao longo do tempo, devido aos efeitos de degradação, provando que a técnica GC-MS apresenta fraca reprodutibilidade para a análise destes compostos.

Tendo em consideração, o fenómeno associado à injeção de catinonas sintéticas no sistema GC-MS e a falta de condições para o desenvolvimento de uma metodologia quantitativa, foi adotada uma abordagem de despiste, utilizando o modo de injeção *splitless*, para α -PVP, α -PVT e MDPV, em amostras de saliva. O método permitiu uma resolução dos compostos, apresentando limites de deteção de 100,0 μ g/L. A

metodologia de microextração permitiu ainda recuperações médias de 43,1 (\pm 13,2), 63,7 (\pm 10,8) e 52,3 (\pm 13,6) para o α -PVP, α -PVT e MDPV, respetivamente.

A metodologia evidenciou bom desempenho em termos de seletividade e boa capacidade de identificação destes três analitos, em amostras de saliva cuja colheita é considerada não evasiva, podendo ser efetuada de forma simples, evitando a sua adulteração.

PALAVRAS-CHAVE:

Novas Substâncias Psicoativas

Catinonas Sintéticas

Análise de Despiste

Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E)

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

Saliva

1. Introdução

Durante a última década, o mundo testemunhou o aparecimento rápido de novas substâncias usadas como drogas recreativas [1]. Na literatura, estas novas substâncias de abuso foram, por vezes denominadas de "designer drugs", "legal highs", "herbal highs" e "saís de banho". Atualmente, este grupo de compostos é definido coletivamente como: "novas substâncias psicoativas" ou, de forma abreviada "NPS's".

O fenómeno das "novas drogas" só recebeu a devida atenção, após ter atingido proporções alarmantes. Entre 2007 e 2013, houve um aumento exponencial do consumo de NPS's entre os grupos etários mais jovens, coincidente com a abertura das chamadas *smartshops*, onde estes tipos de produtos foram vendidos, de forma livre e "camuflada" sob as mais variadas formas, como por exemplo "incenso", "comprimidos", "pó", "saís de banho", "neve para decoração", entre muitos outros [2].

Inicialmente, os produtos mais frequentemente encontrados à venda em *smartshops* eram produtos naturais como *salvia divinorum* ou os denominados cogumelos mágicos. A segunda vaga de produtos a chegar as *smartshops* consistia numa série de produtos sintéticos, os chamados "herbal highs" (essencialmente canabinóides sintéticos) e, posteriormente, uma série de substâncias que surgiram como resultado de investigação laboratorial (denominadas catitonas sintéticas e derivados) [3].

De uma forma geral, a segunda vaga de produtos reunia um grupo de substâncias que foram, inicialmente sintetizadas com o objetivo de serem utilizadas para fins medicinais. Os meios de síntese e os efeitos destes compostos foram amplamente divulgadas na literatura no passado e alguns autores referem que "apenas serviram para serem redescobertos mais tarde, em alguns casos, décadas mais tarde, e reutilizados como drogas de abuso" [4].

De acordo com o *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNDOC), as NPS's são definidas como "todas as substâncias de abuso, sejam estas apresentadas na sua forma pura ou em forma de preparado, que não são controlados pela Convenção de 1961 (Lista de Estupefacientes) e pela Convenção de 1971 (Lista de Substâncias Psicotrópicas), mas que podem representar uma ameaça para à saúde pública".

Na Europa, entre 2000 e 2005, através do *Sistema de Alerta Rápido da União Europeia* (EWS), surgiam por ano em média 5 novas substâncias psicoativas. Entre 2008 e 2011, o *Observatório Europeu da Droga e Toxicoddependência*, igualmente designado

de *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (OEDT /EMCDDA)*, comprovou a tendência do crescimento do fenómeno das *smartshops* no continente europeu, registando um aumento considerável na diversidade de produtos sintéticos disponíveis neste tipo de estabelecimentos.

Atualmente, a *EMCDDA* monitoriza mais de 560 NPS's, sendo que 98 dessas substâncias foram apenas reportadas, pela primeira vez, em 2015 [5]. Estima-se que cerca 2,9 milhões de pessoas com idades entre os 15 e os 24 anos na União Europeia, já consumiu, pelo menos uma vez na vida uma NPS [6].



Figura 1.1 – Desafios associados ao fenómeno das novas substâncias psicoativas (NPS's).

A falta de definições comuns, o número crescente de classes de substâncias consideradas como NPS's, e as diferenças na legislação existentes de país para país representam um desafio para a realização de estudos precisos sobre o seu consumo (figura 1.1) [7].

Responder com rapidez e eficácia à venda de NPS's, algumas dos quais se revelam altamente tóxicas, constitui um dos maiores desafios por parte entidades reguladoras [5]. A velocidade com que novos compostos são introduzidos no mercado e posteriormente modificados de modo a evitar a sua deteção ou legislação, coloca a sociedade científica e as identidades governamentais, num “jogo infinito de gato e rato” [8, 9].

1.1. O Consumo de Novas Substâncias Psicoativas em Portugal

De acordo com o *Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências* (SICAD) a primeira *smartshop* existente em Portugal, remota a 2007. Entre 2007 e 2010, o fenómeno das denominadas *smartshops* não teve grandes impactos de discussão pública em Portugal, tal como se sucedia nos restantes países europeus. Assim, o número de *smartshops* foi aumentando de forma discreta até 2013, ano no qual se registavam cerca de 63 estabelecimentos comerciais [3].

A Direção-Geral da Saúde (DGS), após a propagação do fenómeno, insistiu aos hospitais do Serviço Nacional de Saúde que reportassem todos os casos graves registados nos serviços de urgência suspeitos de terem sido desencadeados pelo consumo de NPS's. Durante o período de 1 de Outubro de 2012 a 31 de Dezembro de 2012, registou-se um total de 34 notificações recebidas pelas cinco Administrações Regionais de Saúde, onde se verificava que os consumidores que recorreram às urgências (80 %) são indivíduos pertencentes a uma faixa etária jovem, sendo a sua idade inferior a 30 anos. Verificou-se que 26,4 % da amostra representativa das notificações recebidas, que os indivíduos já tinham experienciado episódios anteriores, em consequência do consumo de NPS's, sem nunca ter recorrido aos serviços de urgência [3].

O estudo realizado pela DGS, ao contrário das informações veiculadas pela comunicação social portuguesa (figura 1.2), não revelou nenhuma notificação com registo de óbito ou paragem respiratória, sendo que os diagnósticos mais frequentemente identificados foram estado confusional agudo (44,1 %), episódio psicótico agudo (44,1 %), ansiedade (32,4 %) e arritmias (11,8 %). Contudo, dos 34 casos reportados, registaram-se dois casos (5,9 %) de coma e 47 % dos episódios obrigou a internamento hospitalar dos pacientes. Relativamente a sequelas observadas nas notificações recebidas, manifestou-se a prevalência de sequelas ao nível da saúde mental (14,7 %) [3].

Na Região Autónoma da Madeira (RAM), a situação parece tornar proporções mais drásticas uma vez que ocorreram 308 episódios de urgência hospitalar e 63 casos de internamento na Unidade de Tratamento de Toxicodependentes, apenas no decorrer do ano de 2012. O estudo realizado pela Secretária Regional dos Assuntos Sociais da Madeira, revelou que o fenómeno das novas substâncias psicoativas demonstra contornos diferentes, quando comparado com o fenómeno registado em Portugal continental. No caso da RAM, o consumo de novas substâncias psicoativas concentrava-se numa população adulta (57 %), maioritariamente na situação de desemprego [3].



Figura 1.2 – Notícias na comunicação social portuguesa sobre o fenómeno das NPS's.

1.2. A “Nova Lei das Drogas” – A Legislação Portuguesa

De acordo com Decreto-Lei n.º 54/2013, são consideradas NPS’s “as substâncias não especificamente enquadradas e controladas ao abrigo de legislação própria que, em estado puro ou numa preparação, podem constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias previstas naquela legislação, com perigo para a vida ou para a saúde e integridade física, devido aos efeitos no sistema nervoso central, podendo induzir alterações significativas a nível da função motora, bem como das funções mentais, designadamente do raciocínio, juízo crítico e comportamento, muitas vezes com estados de delírio, alucinações ou extrema euforia, podendo causar dependência e, em certos casos, produzir danos duradouros ou mesmo permanentes sobre a saúde dos consumidores” [10].

A nova legislação portuguesa, denominada “Nova Lei das Drogas” (figura 1.3) vem assim, desta forma, proibir a produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, posse e a disponibilidade de 139 NPS’s. Esta lei, também prevê uma atualização progressiva da lista de substâncias controladas a cada 18 meses [2]. Atualmente, em Portugal, cerca de 159 novas substâncias psicoativas são controladas perante a nova lei [2, 11]. Esta legislação, divide as NPS’s em tipologias ligeiramente diferentes das propostas pelo *UNODC*. Assim, em Portugal, as NPS’s são divididas em: feniletilaminas e derivados, piperazinas e derivados, derivados da catinona, canabinóides sintéticos, derivados/análogos da cocaína, plantas e respetivos constituintes ativos e “outras” [2, 5].



Figura 1.3 - A “Nova Lei das Drogas” noticiada na comunicação social.

1.3. Catinonas Sintéticas: da Folha de *khat* aos “Sais de Banho”

A mastigação da folha de *khat* provoca efeitos estimulantes e a sua prática remota a alguns séculos atrás. Atualmente, esta pratica ainda é predominante em países como a Somália, o Quênia e a Etiópia [12]. Em 1975, a catinona foi isolada a partir de folhas de *khat* e identificada como sendo o principal componente psicoativo presente, contudo a primeira catinona sintética sintetizada remota a 1928, quando a metacatinona foi sintetizada na Alemanha. No ano seguinte, ocorreu a síntese da mefedrona [12, 13].

Ao longo dos anos, várias catinonas sintéticas foram investigadas com o intuito de serem usadas clinicamente como anorexígenos, estimulantes do sistema nervoso central e/ou antidepressivos. No entanto, a sua utilidade clínica foi dificultada tendo em conta que os compostos levavam a dependência e abuso da mesma. Atualmente, a Dietilpropiona, comercialmente conhecida como Anfepramona é um fármaco anorexígeno, disponível no mercado que auxilia no tratamento da obesidade, sendo o seu uso pouco frequente tendo em conta as suas potencialidades em causar dependência [13].

A bupriona, previamente conhecida como “Anfebutamona”, é utilizada clinicamente devido as suas propriedades antidepressivas. Contudo este composto, contém características de antagonista nicotínico, sendo por esse motivo utilizado para tratar a dependência do tabaco [13].

O início da utilização em larga escala de catinonas sintéticas como “substância recreativa” foi relatado em 2004, na Ásia, Israel, na União Europeia e nos Estados Unidos da América (EUA) [4]. Esta classe de compostos surgiu em *smarthshops*, sendo frequentemente vendidas como "sais de banho" ou “fertilizantes”. [14] Os "sais de banho” são principalmente comercializados sob a forma de pó inodoro, branco, amarelado ou marrom ou sob a forma de cristais finos. Apesar de uma menor frequência, este tipo de compostos também pode ser comercializado sob a forma de comprimidos ou cápsulas. Na Europa, o preço associado a estes produtos varia entre 18 € e os 25 € por grama [6].

A produção de “sais de banho” parece ter lugar principalmente na China e na Índia [15], sendo posteriormente importadas para a Europa, onde são embaladas, em pacotes coloridos, e comercializadas como «drogas legais» ou vendidos no mercado ilegal [8]. Estes produtos chegam aos consumidores, com nomes comerciais considerados bastante atrativos, como por exemplo: “Xtacy”, “Dynamite”, “Euphoria”, “Explosion”, “Loved Up”, “Rocket Fuel”, “Sextasy”, “Torpedo”, “Aurora”, “Bliss”, entre outros. Esses nomes comerciais podem aludir a substância que comporta o produto, ou ao efeito desejado/esperado pelo consumidor (figura 1.4) [6, 8].



Figura 1.4 – Produtos vendidos em *smatshops*, que contém catinonas sintéticas na sua composição.

Apesar de aparecerem no mercado rotulados com avisos de “não para consumo humano” e/ou “não testado para perigos ou toxicidade”, os consumidores tem consciência que o produto adquirido se destina a produzir um efeito psicoativo semelhante ao consumo de estimulantes ilegais, nomeadamente, metanfetaminas, ecstasy ou cocaína [15]. A lista de efeitos desejados, por parte dos usuários de catinonas sintéticas, inclui o aumento da energia, empatia, abertura, aumento da sua capacidade de trabalho e aumento da libido sexual [14,16].

As vias de administração mais comuns, utilizadas pelos consumidores de catinonas sintéticas são a insuflação, ingestão oral de cápsulas ou comprimidos, diluição do composto com água ou sumo, ou por “Bombing”, no qual o pó é embrulhado em papel

de cigarro e engolido [16, 17]. Outra forma de administração conhecida entre os consumidores é o método de “Keying”, onde uma chave é mergulhada no pó e, em seguida, insuflado [11, 16]. No entanto, existem relatos que estes compostos podem ser auto-administrados por injeção intravenosa/intramuscular, sendo esta via de administração um fenômeno de nível relativamente baixo e localizado (Roménia e Hungria), restrito a determinados grupos de usuários de drogas de alto risco [12].

A metilona, substância análoga ao MDMA, foi a primeira catinona sintética reportada ao *EMCDDA*. Em 2007, relatos de uso de 4-metil-methcathinone (mefedrona) surgiram pela primeira vez em Israel, alastrando-se posteriormente a outros países e regiões, incluindo a Austrália, Escandinávia, Irlanda e Reino Unido [18]. Desde então, foram identificadas 103 novas catinonas, 26 das quais foram reportadas apenas no ano de 2015 [5].

A mefedrona, a metilona e o MDPV têm sido as catinonas sintéticas, mais usadas pelos consumidores nos últimos anos e o seu consumo encontra-se relacionado com um número crescente de incidentes causados pelos efeitos adversos destes compostos [14]. Após a introdução de leis regulamentares que proíbem estes compostos, rapidamente foram substituídos por outros, estruturalmente semelhantes como por exemplo o 4-MEC (4-methyl-N-ethylcathinone), o 4-MPPP (4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone) e o α -PVP (α -pyrrolidinovalerophenone) [6]. Esta alteração estrutural tem como objetivo alterar a estrutura química das substâncias de forma a que os novos compostos mantenham a sua atividade estimulante e simultaneamente evitar a sua deteção através das metodologias analíticas usadas pelos laboratórios de rotina [19].

1.3.1. Estrutura química das catinonas sintéticas

As catinonas sintéticas estão estruturalmente relacionados com as anfetaminas, sendo que ambas são consideradas feniletilaminas substituídas, sendo que as catinonas sintéticas são distinguidas devido a presença de um grupo cetona no carbono- β [14].

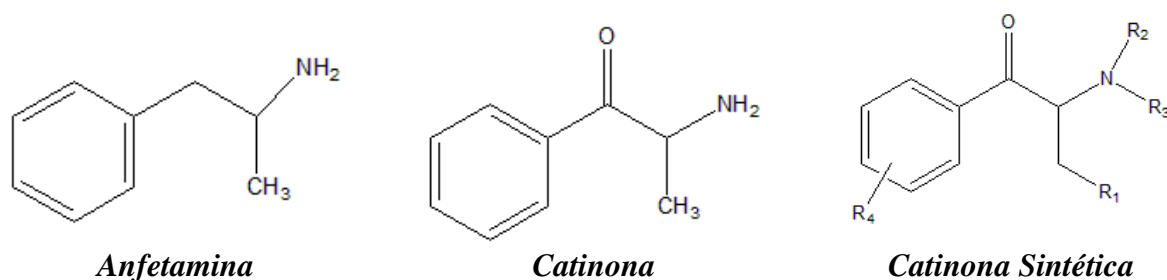


Figura 1.5 – Estrutura química da anfetamina, catinona e estrutura genérica das catinonas sintéticas.

Em termos químicos, as catinonas sintéticas, de acordo com alguns autores, podem ser divididas em quatro famílias [11]:

- i. Catinonas sintéticas com estruturas químicas *N*-alquiladas em R₂ e/ou R₃ (ex. mefedrona);
- ii. Catinonas sintéticas com um grupo 3,4-metilenodioxo adicionado ao anel de benzeno em R₄ (ex. metilona);
- iii. Catinonas-pirrolidinas, as quais são caracterizadas pela presença de um anel de pirrolidina em substituição do átomo de azoto (ex. α -PVP);
- iv. Catinonas sintéticas caracterizadas pela presença de um anel de pirrolidina e um grupo 3,4-metilenodioxo adicionado ao anel de benzeno em simultâneo (ex. MDPV, MDPPP, MDPBP).

Contudo, novas famílias tendem a surgir ao longo dos anos. Por exemplo, a α -PVT (α -Pyrrolidinopentiothiophenone), uma catinona sintética identificada no Japão em 2013, é caracterizada pela presença de um grupo tiofeno, onde se situa normalmente um anel de benzeno e um anel de pirrolidina em substituição do átomo de azoto.

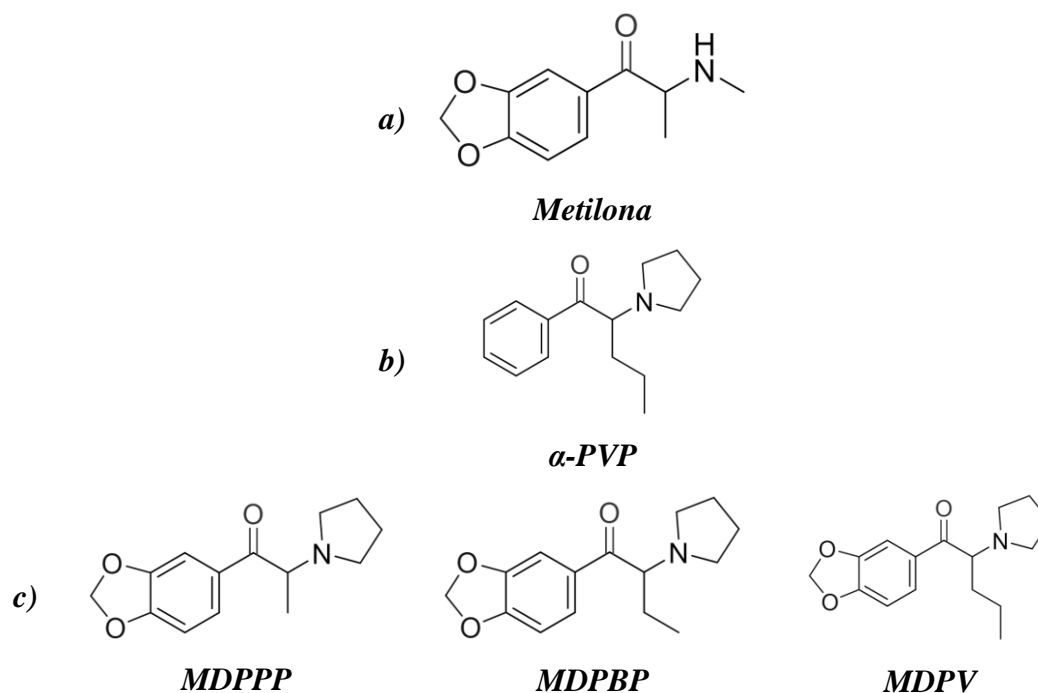


Figura 1.6 – Diferentes catinonas sintéticas e as suas estruturas (**a**- Adição 3,4-metilenodioxí ao anel benzeno; **b**- Catinonas-pirrolidinas; **c**- Catinonas-pirrolidinas com adição 3,4-metilenodioxí ao anel benzeno simultaneamente).

1.3.2. Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas

Atualmente os conhecimentos sobre os efeitos adversos provenientes do consumo de catinonas sintéticas é amplamente baseado em relatos de casos, registrados por organizações especializadas e vigilantes, assim como de centros de vigilância e hospitalares. Contudo, é importante conotar que estes registros são suscetíveis a falhas inerentes, tendo em conta que os usuários podem não ser precisos sobre as substâncias ingeridas, as quantidades ingeridas e/ou a presença de outros adulterantes e/ou drogas presentes (poli-doses) [13].

Alguns casos de intoxicação fatal têm sido associados ao consumo de mefedrona, MDPV, butilona e metacatinona, sendo que em muitos dos casos referenciados, as análises laboratoriais revelaram o consumo simultâneo de outras substâncias de abuso [20].

Tabela 1.1 – Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas. [9, 12, 13, 17, 21, 22]

Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas		
Taquicardia	Confusão	Dor de Cabeça
Insônia	Hipertensão Arterial	Dificuldades de Memória
Agitação	Alucinações	Aumento de Suor
Depressão	Hipertermia	Comportamento Bizarro
Vertigens	Espasmos Musculares	Comportamento Violento
Tonturas	Ataques de Pânico	Pensamentos Suicidas
Náuseas	Vômitos	Palpitações

1.3.3. Farmacocinética das catinonas sintéticas

Existe uma escassez de informação científica sobre o comportamento farmacocinético das catinonas sintéticas no organismo humano, ou seja os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação destes compostos quando consumidos ainda é nos dias de hoje um ponto de discussão científica [4, 12]. Contudo, as catinonas sintéticas, contendo o anel de pirrolidina na estrutura molecular, tem uma maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, uma vez que este grupo funcional confere uma baixa polaridade e uma maior lipofilicidade a estrutura molecular destes compostos [14].

1.3.4. Farmacodinâmica das Catinonas Sintéticas

Ao nível da farmacodinâmica, isto é, as ações farmacológicas e os mecanismos pelos quais as catinonas sintéticas atuam, parecem ser semelhantes ao mecanismo das anfetaminas [13], exercendo os seus efeitos estimulantes através do aumento da concentração de catecolaminas (neurotransmissores), nomeadamente dopamina, serotonina e norepinefrina [14]. Tendo como base as semelhanças estruturais observadas, será previsível que as catinonas sintéticas produzam efeitos idênticos a outras anfetaminas e MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina) [11, 23].

Embora as drogas com efeitos estimulantes não se encontrem associadas a casos de abuso sexual, a metilona foi identificada nos Estados Unidos em seis casos. É importante, ter em conta que a metilona provoca efeitos semelhantes as anfetaminas, podendo produzir um estado mental de confusão, e tal como as anfetaminas, estes compostos quando ingeridos com outras drogas e/ou álcool podem induzir efeito aditivo ou sinérgico [24].

A síntese de novos compostos, com pequenas diferenças moleculares, sintetizados a partir de compostos anteriormente controlados (narcóticos ou primeira geração de NPS) podem resultar numa grande diferença em termos de atividade biológica e dos parâmetros farmacocinéticos [6].

1.4. Análise de Catinonas Sintéticas: Técnicas e Desafios

As catinonas sintéticas estão a entrar no mercado das drogas a uma velocidade superior ao tempo que é necessário para que estes novos compostos sejam restritos, através de processos regulamentares e legislativos adequados. O desenvolvimento de metodologias analíticas, que permitam a identificação, desta classe de composto, podem ajudar a proibir o seu consumo [25].

Na realidade, a identificação e quantificação de catinonas sintéticas representa um desafio analítico para os investigadores, uma vez que novas versões estruturais são, continuamente e rapidamente, introduzidas no mercado, de modo a evitar regulamentos legais a uma velocidade superior ao tempo necessário para a existência de materiais de referência. Ainda assim, quando existem materiais de referência disponíveis no mercado, estes tendem a ser economicamente desvantajosos ou a não possuírem um respetivo padrão-deuterado disponível, para uso de uma análise quantitativa [26].

Devido ao número considerável de compostos distintos atualmente disponíveis no mercado, os métodos analíticos científicos desenvolvidos que contribuam para a identificação destes compostos, sejam eles aplicáveis a *seized products* ou a amostras biológicas, são uma contribuição importante para melhorar a capacidade de resposta das entidades reguladoras [2].

As catinonas sintéticas não são detetadas através de métodos standardizados (ex: imunoensaio) para determinação de drogas de abuso consideradas “clássicas”, como a cocaína e o MDMA, sendo necessário o recurso a instrumentação mais robusta [14]. Para identificar a presença de catinonas sintéticas, deverão ser utilizadas abordagens analíticas que impliquem a determinação de, pelo menos, dois parâmetros não correlacionados, sendo que um destes deverá fornecer a informação estrutural química do composto [27].

As técnicas hífenadas, assumem destaque na análise de catinonas sintéticas em matrizes biológicas, sendo a cromatografia líquida associada a espectrometria de massa em *tadem* (LC-MS/MS) a mais comum, seguindo-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) com recurso a derivatização [28, 29].

1.5. Técnicas Cromatográficas Hífenadas: Sistema GC-MS

A cromatografia abrange um conjunto de métodos de separação nos quais os componentes de uma mistura se dissolvem numa fase móvel (um gás, líquido ou fluído supercrítico) que atravessa uma fase estacionária imiscível. À medida que a amostra migra através da fase móvel, os seus componentes vão-se separando de acordo com os respetivos coeficientes de distribuição, de modo a que os componentes com maior afinidade com a fase estacionária, vão ficar retidos movendo-se de forma mais lenta (maior tempo de retenção, t_R), enquanto os componentes com maior afinidade com a fase móvel migram mais rapidamente (menor t_R) [30].

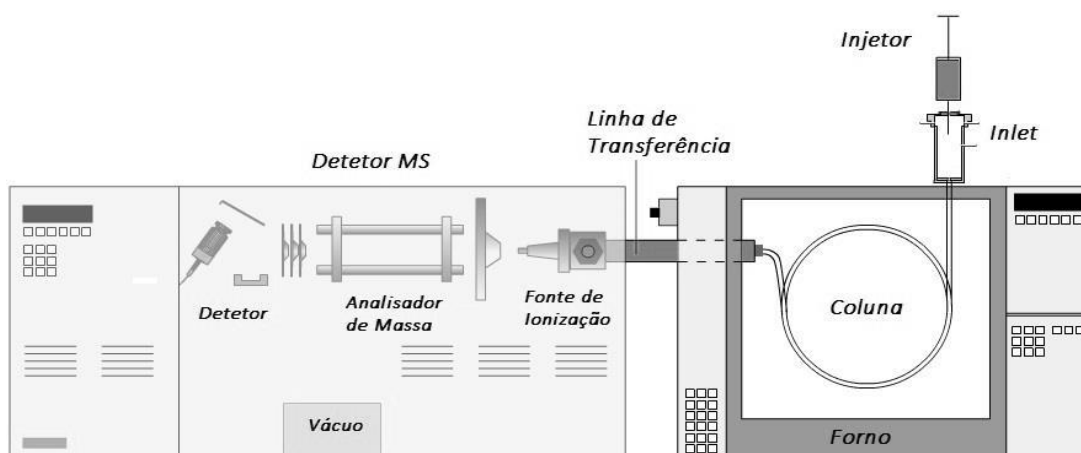


Figura 1.7 – Cromatógrafo gasoso acoplado a um detetor de massa (GC-MS).

As técnicas cromatográficas, podem ser classificadas atendendo a fase móvel utilizada para a separação dos componentes de uma mistura. Assim, quando um gás é utilizado como fase móvel, podemos classificar o sistema como um cromatógrafo em fase gasosa /cromatografia gasosa (GC) [31, 32]. Um sistema de GC é basicamente constituído por um injetor, uma coluna cromatográfica colocada num forno e um detetor, controlados por *software* adequado [31]. A figura 1.7. ilustra um esquema simplificado dos componentes básicos de um sistema de GC que neste caso específico se encontra acoplado a um detetor de massa (GC-MS).

Existem diversos tipos de sistemas de injeção, sendo que os mais utilizados operam frequentemente por vaporização isotérmica com (*split*) ou sem repartição de fluxo (*splitless*) ou sob vaporização com temperatura programada (PTV). Na injeção no modo *split*, a amostra é imediatamente vaporizada após a introdução no injetor e repartida, entrando uma pequena parte para a coluna, sendo a outra eliminada através de uma válvula (razão de *split*). A injeção em modo *splitless* é a metodologia de injeção preferencial no que diz respeito a análise vestigial, uma vez que toda a amostra injetada é introduzida na coluna. Por outro lado, o modo de injeção PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de injeção de grandes volumes de amostra [32, 33, 34].

Numa metodologia de injeção PVT (*solvent vent*), a amostra é injetada num *liner* frio. Durante a injeção e após a eliminação do solvente, a amostra fica retida no *liner*, sendo o injetor posteriormente aquecido rapidamente e os analitos transferidos para a coluna cromatográfica, onde são separados posteriormente [32].

Existem dois tipos de colunas para GC, as colunas de empacotamento e as colunas capilares. A grande maioria das análises realizadas recorre a colunas capilares de sílica fundida, recobertas com polimida (plástico resistente a altas temperaturas) de modo a suportar e proteger a coluna da humidade atmosférica. As colunas capilares oferecem maior resolução, menores tempos de análise e maior sensibilidade do que as colunas empacotadas.

Ao nível de deteção, existem diferentes detetores que podem ser utilizados consoante as necessidades de aplicação pretendidas, dos quais se destacam o detetor de ionização de chama (FID), de condutividade térmica (TCD), de captura eletrónica

(ECD), de azoto-fósforo (NPD) e o detetor de massa (MS). Um detetor ideal deve ser sensível, seletivo, estável, reproduzível e dar resposta linear numa gama alargada de concentrações para os analitos em estudo [31].

A GC pode ser acoplada a MS, esta técnica hifenada tem vantagens acrescidas em termos de identificação espectral, sensibilidade e seletividade. Esta técnica hifenada tem a capacidade de responder a todos os compostos orgânicos voláteis e semivoláteis [31].

No sistema GC-MS, a amostra é introduzida no injetor do cromatógrafo em fase gasosa, e após a separação (na coluna) entram, por intermédio de uma interface, na câmara de ionização onde são bombardeados por um feixe de eletrões, ocorrendo a ionização e posterior fragmentação. A fonte de ionização, mais comum num sistema GC-MS é a eletroionização (EI). No entanto, esta fonte de ionização, poderá ser demasiado “brusca” para alguns analitos que tendem a fragmentar facilmente, podendo optar-se, nestes casos, por uma fonte de ionização química, que ioniza os compostos alvo de uma forma mais “suave” [32, 31].

O conjunto de iões previamente formados é, posteriormente, desviado e acelerado na direção do analisador de massa, por ação de um campo elétrico onde são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). Os analisadores de massa mais comuns são a armadilha de iões (*ion trap*), quadrupolo e tempo de voo. Os iões separados são transferidos para o detetor, genericamente um multiplicador de eletrões que apresenta um tempo de resposta rápido (da ordem dos nanosegundos), capaz de adquirir elevadas correntes, utilizando uma tensão de aceleração a fim de transformar a corrente iónica numa corrente eletrónica suscetível de ser medida, originando um gráfico (espectro) da abundância em função da m/z . Os espectros poderão ser obtidos utilizando o modo de varrimento contínuo (*full-scan*), que permite a identificação de compostos em amostras desconhecidas com recurso a bibliotecas espectrais de referência ou o modo de monitorização de iões previamente selecionados (SIM), modo de elevada sensibilidade e seletividade, que permite a quantificação vestigial dos compostos de interesse [31].

1.5.1. Análise de catinonas sintéticas por cromatografia gasosa GC-MS

A GC-MS é uma das técnicas mais comuns na análise de substâncias de abuso. Esta técnica hifenada é bastante útil, uma vez que ocorre uma separação cromatográfica dos analitos, presentes numa mistura, e uma posterior dedução dos diferentes grupos funcionais que identificam esse mesmo analito, através da análise do correspondente espectro de massa [35].

Apesar de serem compostos termolábeis, o pico molecular das catinonas sintéticas pode ser observado num espectro de massa, apenas utilizando uma fonte de ionização química, sendo então este método de ionização é um método mais “suave” e por sua vez mais sensível para a determinação deste tipo de compostos [36].

De acordo com a literatura, o GC-MS é utilizado como técnica secundária na identificação de *seized products*. No caso de matrizes biológicas, as metodologias encontradas para a quantificação e identificação destes compostos, englobam um processo de derivatização, e geralmente a metodologia apenas reproduz resultados para um grupo pequeno de catinonas sintéticas [29, 37]. No entanto, na literatura alguns autores propõem metodologias para a quantificação de MDPV e do α -PVP, utilizando o GC-MS, sem recurso a derivatização previa [38].

Os *troubleshooting* associados a análise de catinonas sintéticas, por GC-MS, tem vindo a ser recentemente discutidos na literatura. Na realidade, as catinonas sintéticas, quando analisadas por GC-MS vão sofrer uma degradação *in situ*, descrita como degradação térmica, dando origem a produtos de degradação que partilham os mesmos fragmentos que o analito correspondente, à exceção do pico base, onde se verifica uma diferença de -2 Da. Esta perda de massa é atribuída à perda de 2 hidrogénios, provavelmente devido a um processo de oxidação, do qual resulta um grupo enamina ou imina [37, 39].

A presença do produto de degradação tem sido menosprezada na literatura, tendo sido evidenciado, pela primeira vez em 1994, durante a síntese da metacatinona [40], sendo apenas elucidada por um grupo restrito de autores nos anos seguintes [36, 38, 41].

Na atualidade, um grupo de investigadores desenvolveu uma metodologia sensível e seletiva para a determinação simultânea de catorze catinonas sintéticas e feniletilaminas no sangue, humor vítreo e fluido pericardial, com recurso ao GC-MS. Contudo na nova metodologia apresentada, os investigadores recorrem a derivatização por microondas, que apesar de ser considerada uma técnica rápida e simples, a sua adoção ainda não foi totalmente adotada pela maioria da comunidade científica [2].

1.6. Técnicas de Microextração Adsorptiva - A Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E)

A crescente preocupação no desenvolvimento de técnicas de preparação de amostras mais “amigas do ambiente”, conduziu ao surgimento de novas técnicas de extração sortiva, como são a microextração em fase sólida (SPME) e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) [43, 44, 45].

Numa metodologia de extração sortiva, os analitos são, geralmente, extraídos de uma matriz aquosa para um polímero líquido imiscível. Num processo de extração sortiva, o processo de extração é controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra, sendo por isso um fenómeno de equilíbrio. Ambas as técnicas de SPME e SBSE podem ser utilizadas diretamente na matriz da amostra assim como no espaço de cabeça (HS) [46, 47].

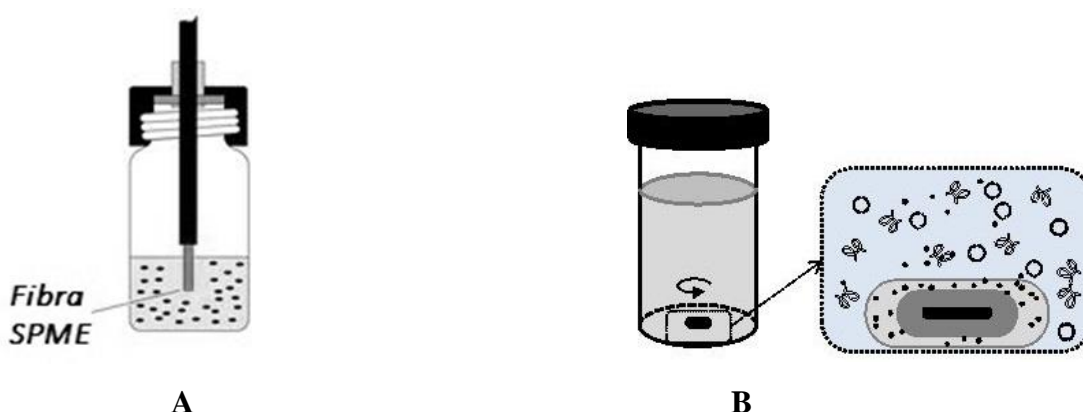


Figura 1.8 – Microextração sortiva (A- SPME ; B-SBSE).

Contrariamente à SPME, para a qual já existem no mercado diversos tipos de revestimentos poliméricos, a extração SBSE apenas se encontram comercializadas barras de agitação revestidas com polidimetilsiloxano (PDMS). Esta fase extratora é bastante termoestável, podendo ser usado para uma variedade alargada de temperaturas e possui excelentes propriedades de difusão. Este material origina ainda baixo ruído instrumental, não promove a decomposição dos analitos alvo e tem a particularidade de poder ser reutilizado [46, 48].

Apesar de todas as vantagens associadas ao uso de PDMS como fase extratora, verifica-se que este responde de forma ineficiente a analitos polares ($\log K_{O/W} \leq 3$) ou termolábeis. Posteriormente, têm surgido fases e novas formas de revestimento para barra de SBSE para além do PDMS, no entanto, apesar dos novos desenvolvimentos, a técnica continua a não apresentar boas eficiências de extração para compostos mais polares [49].

Tendo em consideração que os materiais que apresentem propriedades adsorventes, nomeadamente carvões ativados, sílica gel, zeólitos, argilas, poliuretanos, podem ser excelentes alternativas ao PDMS, desenvolveram-se novas metodologias de extração adsortiva, com o intuito de obter uma maior capacidade extrativa para compostos com elevada polaridade [48].

Neste sentido foi proposta recentemente a microextração adsortiva em barra (BA μ E). Nesta metodologia, em contraste com a extração sortiva, em que os solutos migram para a fase sorvente, o analito interage com locais ativos na superfície da mesma (extração adsortiva). Esta nova metodologia vem, desta forma solucionar algumas das limitações da SBSE(PDMS) [48, 49].

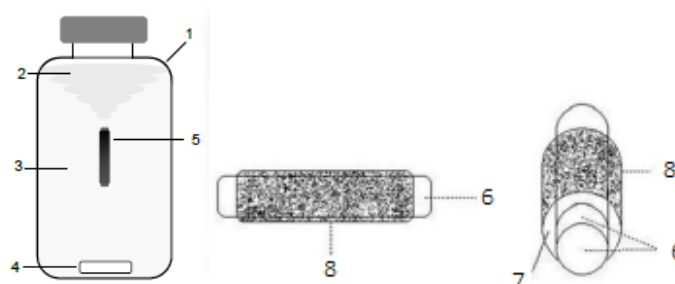


Figura 1.9 - Microextração adsortiva em barra (BA μ E) (1- Frasco de amostragem; 2- Vórtex ; 3- Amostra ; 4- Barra de agitação magnética; 5- Dispositivo de microextração em barra; 6 – Barra de prolipileno; 7- Adesivo; 8- Sorvente)

O processo de extração BA μ E consiste num dispositivo onde se fixa convenientemente os materiais adsorventes (carvões ativados, polímeros de divinilbenzeno-estireno, etc) finamente divididos a um suporte adequado, no qual são colocados num vial de extração contendo a amostra (normalmente com 20 a 30 mL) com auxílio de uma barra de agitação magnética de Teflon, mantendo o meio sob agitação convencional. O mecanismo de agitação promove a flutuação da barra até que se atinja o equilíbrio [47, 49].

Os dispositivos BA μ E podem ser aplicados a matrizes reais, particularmente a amostras aquosas com origem ambiental ou biológica e tem demonstrado um excelente desempenho para a extração de uma gama alargada de classes de compostos [51–55].

No entanto, tal como o SBSE, a metodologia BA μ E requiere etapas de otimização, antes da sua aplicação. Para otimizar a extração é necessário ter em conta parâmetros experimentais como o tempo de equilíbrio entre as fases envolvidas, a velocidade de agitação assim como as características da matriz, nomeadamente o pH, a polaridade e/ou a força iónica, recorrendo-se geralmente a ensaios sistemáticos usando uma estratégia univariante [48].

1.7. Análise de Catinonas Sintéticas em Saliva

A saliva, representa uma matriz vantajosa para a análise de catinonas, tendo em consideração que a análise de outras matrizes biológicas implica a análise do composto ativo e dos respetivos metabolitos. Na realidade, pouco se sabe sobre as vias metabólicas destes compostos, e muitas vezes a identificação dos metabolitos noutras matrizes biológicas (sangue e urina) tornam-se importantes, em termos de interpretação toxicológica dos resultados obtidos [4].

Apesar de possuir uma janela pequena de deteção, a saliva tem boas capacidades como matriz biológica alternativa, tendo em conta que o seu método de colheita é considerado não evasivo, podendo ser realizado apenas recorrendo a um frasco de amostragem de maneira simples, permitindo que o processo de colheita possa ser acompanhado, de modo a evitar a sua adulteração, sem causar qualquer tipo de invasão de privacidade [56, 57].

Tendo em consideração a literatura consultada, a identificação e quantificação de catinonas sintéticas em saliva têm vindo a ser realizada, maioritariamente por recurso a LC-MS. Por outro lado, grande parte das metodologias adotadas são com recurso a *kits* de recolha vendidos comercialmente ou por metodologias SPE [58, 59, 60].

Recentemente, foi apresentada uma metodologia para identificação da catinona e substâncias análogas em saliva por GC-MS e recorrendo a um processo de derivatização [61]. Contudo, de acordo com alguns estudos ainda não é possível derivatizar um grande número de catinonas sintéticas recorrendo a apenas um agente derivatizante, uma vez que estes vão competir entre si e/ou originar produtos de derivatização que não são suficientemente voláteis [37, 62].

1.8. Objetivos

O presente trabalho, teve como objetivo desenvolver uma nova abordagem analítica para despistagem de catinonas sintéticas em saliva aplicando a microextração adsorptiva em barra (BA μ E) como método preparativo. Durante o desenvolvimento da metodologia, estudou-se o comportamento químico das catinonas sintéticas durante a análise por GC-MS, tendo-se avaliado os principais desafios e limitações analíticas inerentes.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, Materiais e Amostras

O metanol (MeOH, 99,8 %) e acetonitrilo (ACN, 99,8 %) foram adquiridos à Fisher (R.U.). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) foi adquirido a partir da Merck (Alemanha). O hidróxido de sódio (NaOH, 98,0 %) foi adquirido à AnalaR (BDH Chemicals, Inglaterra) e o ácido clorídrico (HCl, 34-37 %) à Panreac (Espanha).

Os carvões ativados comerciais em pó, CA1 (área superficial: 1400 m²/g; pH_{pzc}: 2,2), CN1 (área superficial: 1400 m²/g; pH_{pzc}: 6,4), SX Plus (área superficial: 1100 m²/g; pH_{pzc}: 7,5), SX1 (área superficial: 900 m²/g; pH_{pzc}: 8,4), N₂ (área superficial: 896 m²/g; pH_{pzc}: 10,6) e R (área superficial: 937 m²/g; pH_{pzc}: 6,5) foram adquiridos à Cabot Norit (Texas, EUA) e cedidos pela Salmon & Cia. Lda. (Portugal).

O co-polímero modificado de pirrolidona e divenílbenzeno de fase reversa Strata™-X (Strata-X; tamanho das partículas: 33 µm; tamanho dos poros: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) e o polímero divenílbenzeno de fase reversa Strata™-DVB (DVB-Strata; tamanho das partículas: 100 µm; tamanho dos poros: 260 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) foram fornecidos através da Phenomenex (Torrance, CA, E.U.A.). O polímero de divenílbenzeno de fase reversa Merck-DVB foi adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha).

O co-polímero de divinilbenzeno e pirrolidona de troca catiónica Oasis® MCX (MCX; tamanho das partículas: 60 µm; tamanho dos poros: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14), o co-polímero de divinilbenzeno e pirrolidona de troca aniónica Oasis® MAX (MAX Oasis; tamanho das partículas: 30 µm; tamanho dos poros: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14), o polímero de pirrolidona de troca aniónica Oasis® WAX (WAX Oasis; tamanho das partículas: 30 µm; tamanho dos poros: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14; pK_a=6) e o polímero de pirrolidona de troca catiónica Oasis® WCX (WCX Oasis; tamanho das partículas: 30 µm; tamanho dos poros: 80 Å; estabilidade de pH: 0-14), foram adquiridos da Waters Corporation (Franklin, MA, EUA).

Os padrões de metilona, α -PVP, α -PVT, MDPPP, MDPPBP e MDPV foram fornecidos pelo grupo de trabalho liderado pela Dra. Helena Gaspar. Os padrões analíticos fornecidos (pureza > 99% , GC- FID) para a execução do trabalho foram inequivocamente identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS), a partir de 6 produtos apreendidos e fornecidos pelo *Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC/PJ)* .

2.2. Equipamentos e Instrumentação

Para a execução do presente trabalho prático foram utilizadas microseringas de alta precisão com êmbolo flexível e capacidade de 10, 100 e 500 μ L (Hamilton, EUA), micro-pipeta de 5 mL (VWR International, Portugal), micro-pipeta de 200 μ L (VWR International, Portugal), barras de agitação de “Teflon” (VWR International, EUA), frascos de vidro de 25 mL (Macherey – Nagel, Alemanha) com as respectivas tampas (d = 20 mm), inserts de vidro de fundo plano de 0,2 mL (6 \times 31 mm, VWR International, EUA), vials de vidro transparentes de 1,5 mL e com as repetivas tampas (11,6 \times 32 mm, VWR Internacional, Portugal) e um encapsulador manual (Agilent Technologies, EUA).

A nível de equipamentos destacam-se: balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), sistema de banho de ultrassons equipado com termóstato (Branson[®] 3510 E-DTH, EUA), vortex (Velp, Itália), duas placas de agitação múltipla com quinze posições para amostras (Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 15, Alemanha), um sistema de medição de pH - Metrohn 744 pH Meter contendo um elétrodo combinado de vidro (Suíça) e um centrifugador.

As análises foram efetuadas num sistema GC-MS da Agilent Technologies (Alemanha), constituído por um cromatografo em fase gasosa (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV), acoplado a um detetor de massa (Agilent 5973N). Todos os dados registados foram efetuados a partir do software MSD ChemStation (G1701; versão C.00.00; Agilent Technologies, Alemanha). A coluna capilar utilizada foi a uma coluna Phenomenex[®] ZB-5MSi (26m X 250 µm X 0,30 µm).



Figura 2.1 – Sistema GC-MS utilizado (Agilent Technologies).

2.3. Método Experimental

2.3.1. Preparação de soluções padrão

Os padrões fornecidos foram pesados e realizou-se a preparação de *soluções stock* individuais de cada analito em MeOH, as soluções (1 mg/mL) foram armazenadas a 4°C. De modo a defenir as condições instrumentais do presente trabalho as soluções stock iniciais foram diluídas de modo a obter a concentração de 10000 ng/mL. Uma solução padrão, contendo os seis analitos em estudo (10000 ng/mL) foi preparada a partir das soluções stock individuais inicialmente preparadas. Posteriormente, houve necessidade de preparar novas soluções utilizando uma mistura de ACN:MeOH (50:50, v:v).

2.3.2. Condições instrumentais

Para o estudo dos parâmetros instrumentais por GC-MS, as soluções stock individuais de cada analito (10000 ng/mL) foram analisadas individualmente de modo a obter os parâmetros de tempo de retenção e os espectros de massa correspondentes a cada analito. Posteriormente, uma mistura dos analitos (10000 ng/mL) foi utilizada para otimizar as condições cromatográficas.

O modo *solvent vent* (tempo de *vent*: 0,30 min; 50 mL min⁻¹; pressão: 0,0 psi; fluxo de purga: 60,0 mL min⁻¹, tempo 2 min), foi utilizado como método de injeção, tendo a temperatura sido programada desde 60 °C (0,4 min) até 300 °C (até ao final da análise). O volume e a velocidade de injeção foi 20 µL e 100 µL min⁻¹, respetivamente. Como fase móvel, foi utilizado Hélio, mantido no modo de pressão constante (9,82 psi). A temperatura do forno foi programada desde 60 °C até 180°C, a 30 °C/min, sendo posteriormente aumentada aos 300°C (1 min), a 10°C/min, com tempo de corrida final de 18 minutos.

As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e quadrupolo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C respetivamente, tendo sido selecionado um *solvent delay* de 7 minutos. Foi usada ionização eletrónica (70 eV) numa gama de massa compreendida entre 35 e 550 Da, no modo de varrimento contínuo (*full-scan*). No modo SIM, vários grupos de iões alvo foram monitorizados numa janela de tempo definida pela retenção correspondente.

2.3.3. Calibração instrumental

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram igualmente obtidos a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura inicial (10000 ng/mL) em MeOH, até se obter uma razão S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. Simultaneamente, a linearidade instrumental foi estabelecida, usando dezasseis níveis de diluição (13 níveis de diluição para o MDPPP) da solução inicial analisados em triplicado, de modo a obter a precisão instrumental para cada nível de concentração.

2.3.4. Preparação de diapositos BA μ E

As barras de extração adsortiva foram preparadas no laboratório conforme descrito anteriormente [1]. Estas consistem em cilindros de polipropileno (15 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) revestidos com adesivo, sendo de seguida cobertas com os sorventes (carvão ativado ou polímero). Antes da utilização, as barras eram lavadas com MeOH, de modo a remover algumas impurezas que pudessem estar presentes, e posteriormente eram condicionadas em água ultra-pura sob agitação durante 10 minutos.

2.3.5. Ensaios de otimização do processo de extração

Os ensaios de otimização foram efetuados medindo 24,9 mL de água ultra-pura para num frasco de amostragem de vidro apropriado com uma barra magnética. Posteriormente, a solução aquosa era fortificada com 100 μ L da solução padrão contendo 1000 ng/mL de cada um dos analitos de modo a obter uma concentração final de 4 μ g/L por analito. Posteriormente, colocava-se barra de extração e a barra magnética de Teflon selando-se em seguida o frasco de amostragem, com recurso a uma tampa apropriada. A extração era promovida através da agitação da barra magnética à temperatura ambiente. Após a extração, o frasco de amostragem era aberto, retirava-se a barra de extração e colocava-se num vial de vidro (1,5 mL) contendo um *insert* de 200 μ L, sendo posteriormente adicionados 100 μ L de solvente extrator, de modo a efetuar o processo de retroextração, com auxílio de tratamento ultrassónico. Após o processo de dessorção, a barra era retirada do vial, com recurso a uma pinça, previamente limpa, e o extrato era centrifugado, durante 5 minutos a 4000 rpm de modo a eliminar possíveis resíduos de fase extratora que pudessem provocar danos no sistema GC-MS. O extrato, posteriormente era transferido para um novo *insert*, com a ajuda de uma microseringa de alta precisão. Na etapa final o vial era selado e colocado no amostrador automático para posterior análise por LVI-GC-MS(SIM).

Diversos parâmetros foram estudados, seguindo-se uma estratégia de otimização univariante por forma a otimizar a eficiência da extração. Assim, os ensaios de otimização foram realizados tendo em conta o tipo de solvente para retroextração (MeOH, ACN e MeOH:ACN (50:50, v:v)), o tempo de retroextração (15, 30, 45 e 60 min), a velocidade de agitação (750, 990 e 1250 rpm), o tempo de extração (1, 2, 3 e 16

h), pH (2, 5,5 e 12), o modificador orgânico (0, 10 e 20 % em MeOH, v:v) e a força iônica (0, 10 e 20 % em NaCl, m/v) da matriz.

O cálculo da recuperação foi efetuado através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{A_{\text{obt}}}{A_{\text{esp}}} \right) \times 100\%$$

A_{obt} : área obtida / A_{esp} : a área esperada

2.4. Método Experimental para a Metodologia de Despistagem de Catinonas Sintéticas em Saliva

2.4.1. Condições instrumentais

Para a elaboração do método experimental para a metodologia de despistagem do MDPV, α -PVP e α -PVT, foram utilizadas as condições instrumentais descritas anteriormente, no entanto utilizou-se a injeção em modo *splitless*. A temperatura de injeção foi programada desde 280°C (0,4 min) até 200 °C (50 °C /min até ao final da análise). O volume de injeção foi de 2 μ L.

2.4.2. Linearidade instrumental

O limite de detecção (LOD) foi obtido a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura inicial (20000,0 μ g/L) em ACN:MeOH (50:50, v:v), até se obter uma razão S/N de 3/1. Simultaneamente, a linearidade instrumental foi estabelecida, usando seis níveis de diluição da uma solução inicial analisados em triplicado, de modo a obter a precisão instrumental para cada nível de concentração.

2.4.3. Recolha e preparação de amostras

A saliva foi recolhida de 11 indivíduos diferentes (5 do sexo feminino e 6 do sexo masculino), que não consumiram nenhum tipo de substâncias psicoativa nas últimas 12 horas. Foi solicitado que os indivíduos, não fumassem nem que ingerissem qualquer tipo de alimentos 10 minutos antes da recolha. As amostras foram recolhidas, utilizando frascos de amostragem apropriados, e armazenadas a frio (4°C).

Posteriormente, a saliva era colocada num tubo de ensaio, sendo posteriormente centrifugada (5 minutos; 4000 rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante era recolhido para um tubo de ensaio, sendo usado 500 µL (em duplicado) para o processo de extração.

No caso das amostras fortificadas, após a centrifugação, a saliva foi fortificada, utilizando um padrão, previamente preparado (2500 µg/L). Todas as salivas foram fortificadas de modo a que a concentração final de cada analito presente fosse de 500 µg/L.

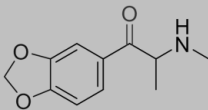
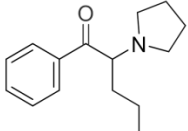
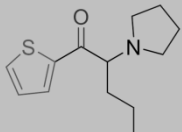
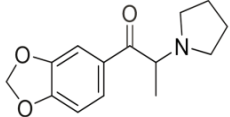
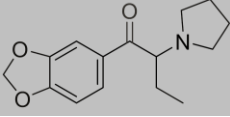
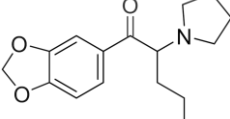
3. Resultados e Discussão

3.1. Condições Instrumentais e o Comportamento de Catinonas Sintéticas

A primeira etapa realizada, para o desenvolvimento da metodologia analítica, foi proceder à determinação das melhores condições instrumentais dos compostos selecionados.

De modo a proceder a identificação dos analitos, recolheu-se informações sobre os compostos e as respetivas informações estruturais, assim como outras relevantes para uma análise por GC-MS, como por exemplo o ião molecular e outros iões fragmentos m/z caraterísticos. A tabela 3.1 ilustra as informações obtidas sobre as catinonas sintéticas em estudo, com as respetivas estruturas químicas e informações relevantes (ião molecular, pico base e outros iões fragmento) para análise por GC-MS.

Tabela 3.1- Tabela informativa contendo as catinonas sintéticas em estudo, com as respetivas estruturas químicas e informações relevantes (pico molecular, pico base e outros iões fragmento) para análise por GC-MS.

Catinonas Sintéticas	Estrutura química	Ião Molecular (m/z)	Pico base (m/z)	Iões Fragmento (m/z)	Referências
Metilona		207	58	121, 149	[1, 2, 3,4]
α -PVP		231	126	105, 77	[2, 5, 6]
α -PVT		237	126	111, 84	[2]
MDPPP		248	98	121, 149	[2, 3, 7, 8]
MDPBP		261	112	121, 149	[1-4]
MDPV		275	126	121, 149	[1, 2, 3, 4, 9]

Uma mistura, contendo os analitos em estudo na concentração de 10000 µg/L foi preparada e analisada por GC-MS, de modo a obter os parâmetros fundamentais como o tempo de retenção (t_R) e o espectro de massa característico para cada substância.

Como previsto, os compostos não apresentavam a presença do íon molecular, uma vez que a fonte utilizada foi de ionização eletrônica. De acordo com a literatura, o pico molecular das cationonas sintéticas pode ser observado num espectro de massa apenas quando a sua análise é efetuada com recurso a uma fonte de ionização mais suave, como a ionização química.

Como é possível observar no cromatograma da figura 3.1, todas as cationonas sintéticas apresentavam um pico de degradação, tal como descrito em algumas fontes bibliográficas [1, 5, 8]. Este produto de degradação, partilha os mesmos fragmentos que o analito correspondente com exceção do pico de base, onde se verifica uma diferença de -2 Da, atribuída à perda de 2 átomos de hidrogénio, durante a injeção dos analitos no sistema GC-MS [1].

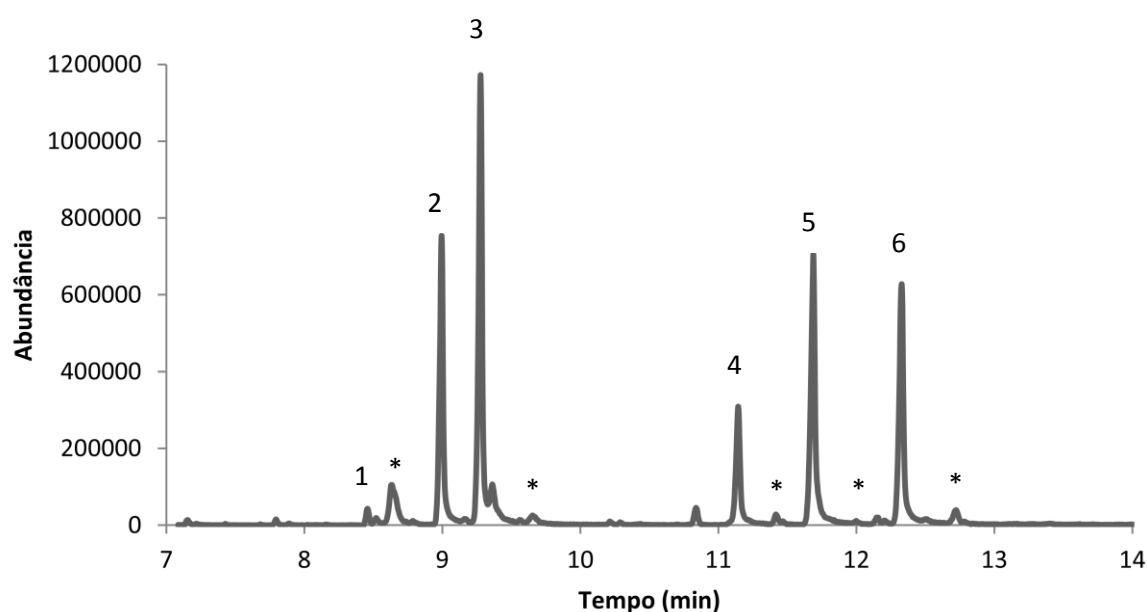


Figura 3.1 – Cromatograma obtido pela injeção de uma solução, contendo 10000 µg/L dos analitos (1- Metilona, 2- α -PVP, 3- α -PVT, 4- MDPPP, 5- MDPBP, 6- MDPV), onde se verificam os repetivos produtos de degradação[*], por LVI-GC-MS (*full-scan*).

Neste sentido, durante a injeção as catinonas sintéticas, perdem-se dois átomos de hidrogênio, pela formação de uma ligação dupla algures na sua estrutura química. Tendo em consideração que no presente estudo, se verificou o pico de degradação da metilona, podemos afirmar que esta ligação dupla não ocorre no anel de pirrolidina, corroborando a ideia de alguns autores [8].

Após se verificar a presença dos produtos de degradação, tal como referido na literatura, procedeu-se a substituição do *liner*. De acordo com estudos previamente realizados, a degradação de catinonas sintéticas pode ser inibida quando é utilizado um novo *liner*, sem pontos ativos [5].

Verificou-se a ausência de degradação para todos os compostos em estudo, com a exceção da metilona (figura 3.2), após a substituição do *liner*. De acordo com o observado, podemos afirmar que a substituição do *liner* apenas previne a degradação das catinonas sintéticas que tem o anel de pirrolidina na sua estrutura química. A metilona, para além de sofrer degradação, apresenta um comportamento demasiado termolábil para que possa ser analisada por GC-MS sem recurso ao processo de derivatização. Neste sentido, o estudo deste composto foi abandonado para a continuidade do trabalho.

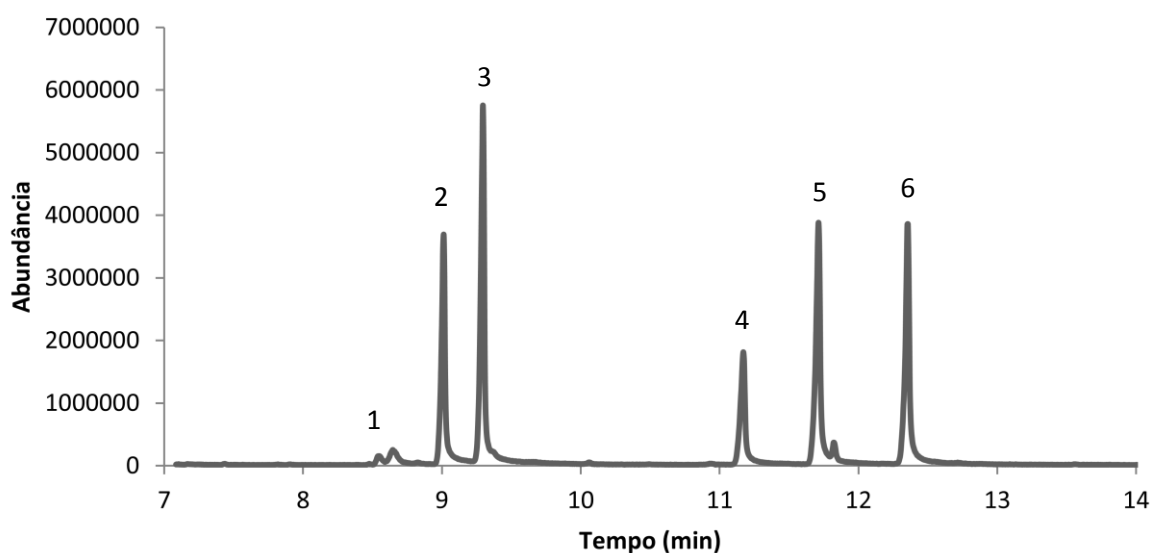


Figura 3.2 - Cromatograma obtido pela injeção de uma solução, contendo 10000 $\mu\text{g/L}$ dos analitos (1- Metilona; 2- α -PVP; 3- α -PVT; 4- MDPPP; 5- MDPBP; 6- MDPV), após a substituição do *liner* por LCI-GC-MS (*full-scan*).

Tendo em consideração que os compostos interagem com o *liner*, durante a injeção no sistema GC-MS, foi realizado um estudo de modo a averiguar se existia retenção dos mesmos no *liner* (denominado de “efeito memória”). Injeções de soluções contendo os analitos foram efetuadas, intercalando diferentes solventes, como por exemplo diclorometano e acetato de etilo. Não se registaram indícios de que os compostos em estudo sofressem “efeito memória”.

Eliminando a presença dos produtos de degradação, foi possível proceder a identificação inequívoca dos analitos em estudo, registando-se os parâmetros fundamentais para se proceder a análise adequada dos analitos, nomeadamente o t_R e os fragmentos caraterísticos obtidos de cada analito.

De modo a alcançar melhor seletividade e sensibilidade, selecionaram-se como iões alvo o pico base e os principais fragmentos obtidos para se operar no modo SIM (tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Tempo de retenção (t_R) e iões selecionados para identificação das catinonas sintéticas, em estudo.

Catinona Sintética	t_R (min)	Iões SIM (m/z)*
α -PVP	8,9	<u>126</u> , 105, 77
α -PVT	9,2	<u>126</u> , 111, 84
MDPPP	11,1	<u>98</u> , 121, 149
MDPBP	11,6	<u>112</u> , 121, 149
MDPV	12,3	<u>126</u> , 121, 149

* Ião sublinhado recomendado para quantificação

Segundo a literatura, a degradação associada a análise de catinonas sintéticas por GC-MS é descrita como sendo do tipo térmica. No entanto, o tempo de residência no injetor e a atividade superficial do *liner* são descritos como os fatores que mais afetam a degradação destes compostos [5]. Apesar da substituição do *liner* ter inibido a degradação, revelou-se pertinente variar a temperatura de injeção e verificar se existiam variações na resposta instrumental dos analitos. Reduziu-se a rampa de temperatura de injeção até aos 200°C, tendo-se verificado que a resposta instrumental nas condições iniciais (temperatura de injeção final igual a 300°C) produzia uma melhor resposta dos analitos (figura 3.3).

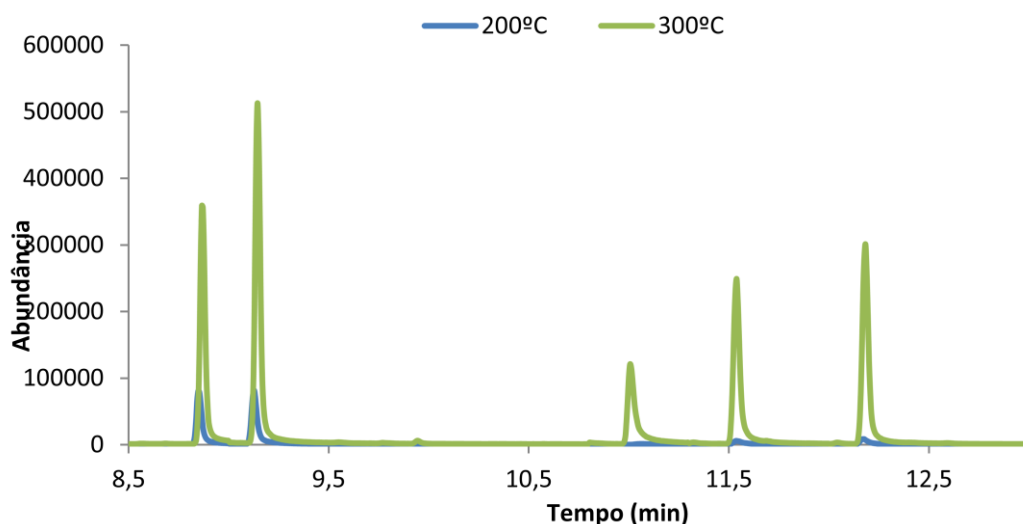


Figura 3.3 – Efeito da resposta instrumental obtida, variando a temperatura final de injeção (200°C e 300°C), obtido por LVI-GC-MS(SIM).

Numa última etapa, avaliou-se os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), assim como a linearidade e a precisão instrumental (Tabela 3.3). Os LOD e LOQ foram obtidos a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura inicial (10000 µg/L) até se obterem razões S/N de 3/1 e 10/1, respectivamente. Simultaneamente, a linearidade instrumental foi estabelecida, usando dezasseis níveis de diluição (13 níveis de diluição para o MDPPP) da solução inicial analisados em triplicado, de modo a obter a precisão instrumental para cada nível de concentração.

Os compostos demonstraram, após a aplicação do método dos mínimos quadrados aos dados obtidos, possuir bons coeficientes de determinação ($\geq 0,9921$) para as calibrações efetuadas.

Relativamente à precisão instrumental, para a gama de concentrações analisadas verificou-se que o α -PVP e o α -PVT apresentam um desvio padrão relativo (RSD) inferior a 11 %, sendo que o MDPPP, o MDPBP e o MDPV apresentaram $RSD \leq 24$ %. Os resultados, permitem observar que as catinonas sintéticas, que possuem um grupo 3,4-metilenodioxido adicionado ao anel benzeno na sua estrutura química, apresentam uma resposta instrumental mais instável.

Tabela 3.3 – Precisão (RSD), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), gama de linearidade e coeficiente de determinação (r^2) das cinco catinonas sintéticas em estudo, obtidos por LVI-GC-MS(SIM) nas condições instrumentais otimizadas.

Catinonas Sintéticas	Precisão Instrumental (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Linearidade	
				Gama de Linearidade ($\mu\text{g/L}$)	r^2
α -PVP	$\leq 11,0$	7,60	25,0	30,0 – 10000,0	0,998
α -PVT	$\leq 10,5$	7,60	25,0	30,0 – 10000,0	0,998
MDPPP	$\leq 20,0$	18,3	60,0	100,0 – 10000,0	0,993
MDPBP	$\leq 24,0$	7,60	25,0	30,0 – 10000,0	0,995
MDPV	$\leq 17,3$	7,80	25,0	30,0 – 10000,0	0,997

As condições cromatográficas otimizadas permitiram boa resolução dos cinco compostos em estudo (figura 3.4).

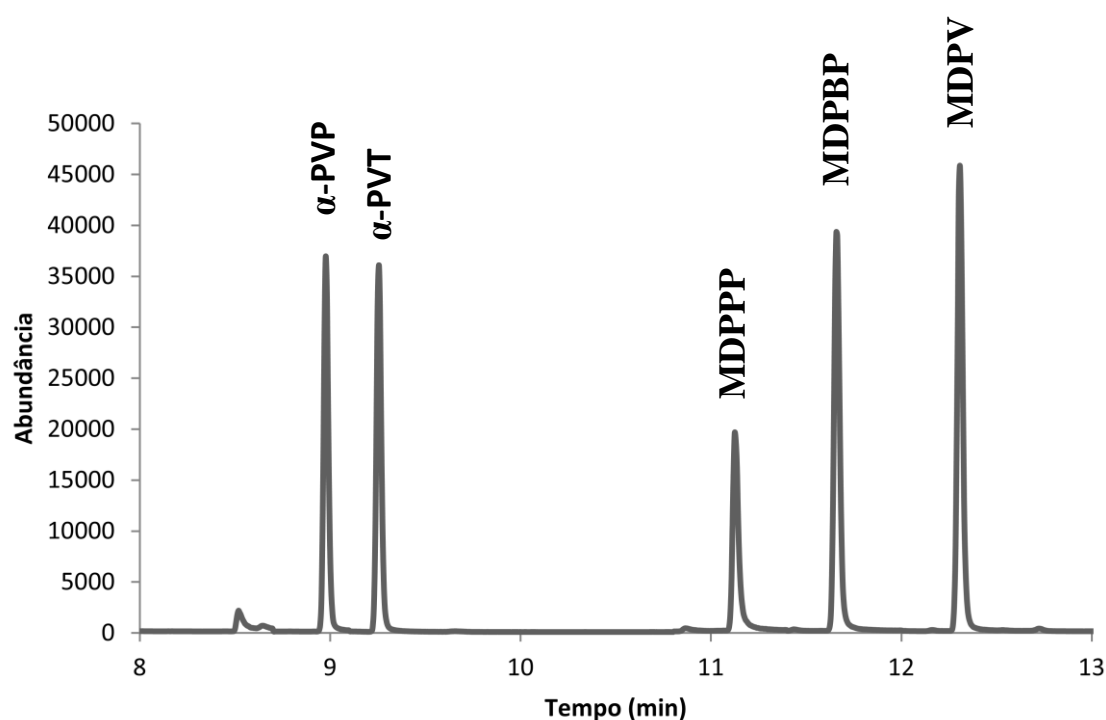


Figura 3.4 – Cromatograma de uma solução contendo as cinco catinonas sintéticas (1000 $\mu\text{g/L}$) em estudo, obtidos por LVI-GC-MS(SIM) nas condições instrumentais otimizadas.

3.2. Otimização da Metodologia de Extração

Após estabelecidas as condições instrumentais, seguiu-se a otimização do processo de microextração adsortiva em barra (BA μ E). Este processo, divide-se sobretudo em 3 partes distintas. Numa primeira fase, ocorre a seleção do sorvente, sendo posteriormente os parâmetros que poderão afetar quer o processo de retroextração quer o processo de extração, conforme ilustra a figura 3.5.

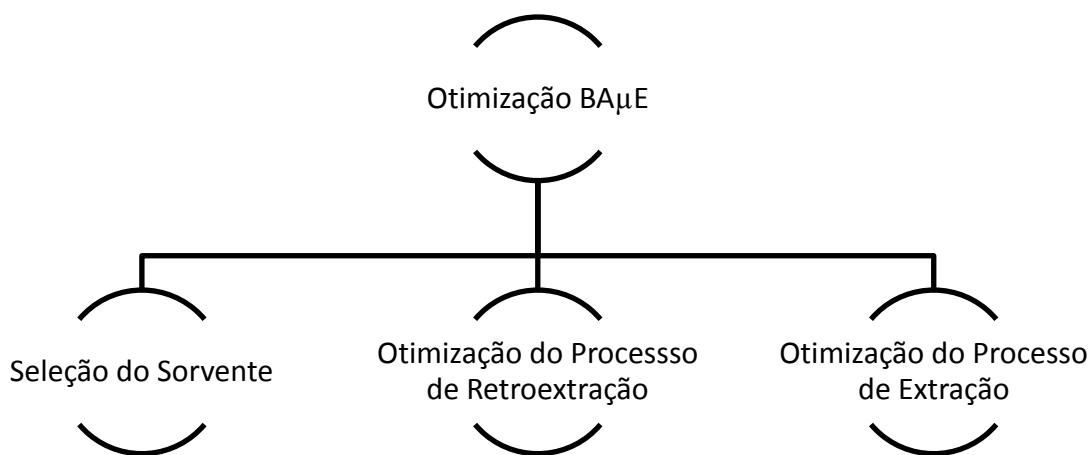


Figura 3.5 – Etapas de otimização BA μ E [10].

3.2.1. Seleção do sorvente para o diapositivo BA μ E

A primeira etapa realizada durante a otimização foi a seleção do sorvente a ser usado para a realização da microextração dos compostos em estudo. Foram testados no total seis carvões ativados (N2, SX1, R, CA1, CN1 e SX Plus) e sete polímeros (DVB Merck, DVB Strata, Strata-X, WCX Oasis, WAX Oasis, MCX Oasis e MAX Oasis) como fases extratoras.

Os ensaios foram realizados em triplicado para cada material sorvente. Um ensaio em branco foi realizado por cada sorvente. Para os ensaios foram usadas as seguintes condições padrão:

- Tempo de extração: 16 horas
- Velocidade de agitação: 990 rpm
- pH: 5,5
- Solvente de retroextração: MeOH (100 μ L)
- Tempo de retroextração: 30 min, sob tratamento ultrassônico

Tendo em conta os seis carvões testados, apenas três foram efetivos na extração dos compostos em estudo. O carvão ativado SX1 foi o sorvente que permitiu melhores recuperações dos compostos. Contudo, a recuperação foi inferior a 28,5 %.

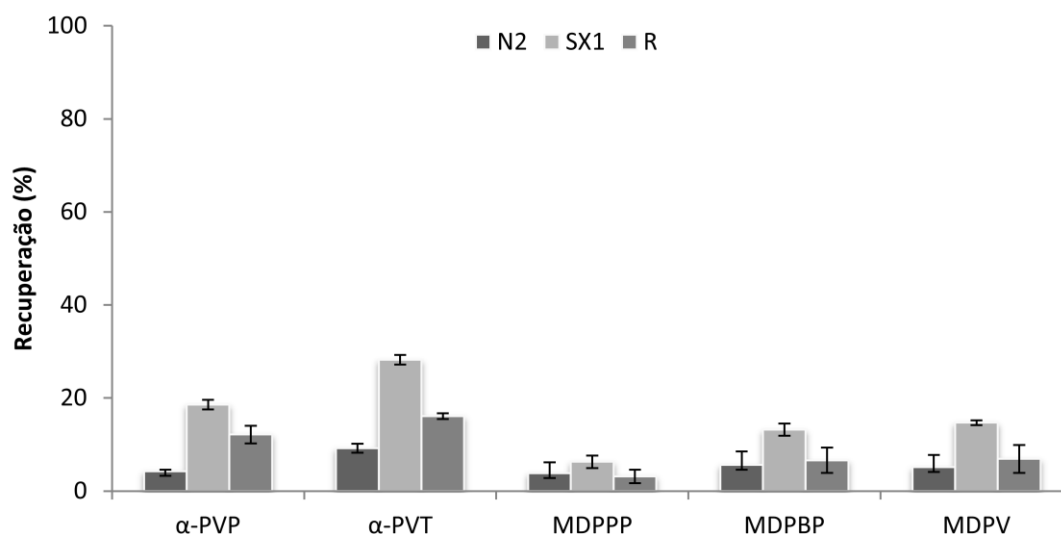


Figura 3.6 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes carvões ativados testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 μ g/L; extração: 16 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH, 30 min sob tratamento ultrassônico].

Os fracos desempenhos da utilização de carvões ativados como sorventes extratores para os analitos em estudo, poderão advir de diversos fatores, nomeadamente do comportamento destes relativamente ao pH do meio [11]. Por exemplo, as interações eletrostáticas e/ou dispersivas entre os carvões ativados e os analitos em estudo, poderão ter sido dificultadas uma vez que os carvões podem estar carregados positivamente ou negativamente para o valor de pH do meio, dependendo do respetivo valor pH_{pzc} (ponto de carga zero). Para além disso, é necessário ter em conta que os carvões ativados possuem diferentes áreas superficiais, diferentes tamanhos de partículas e diferentes dimensões de poro, fatores que poderão culminar numa melhor ou pior recuperação.

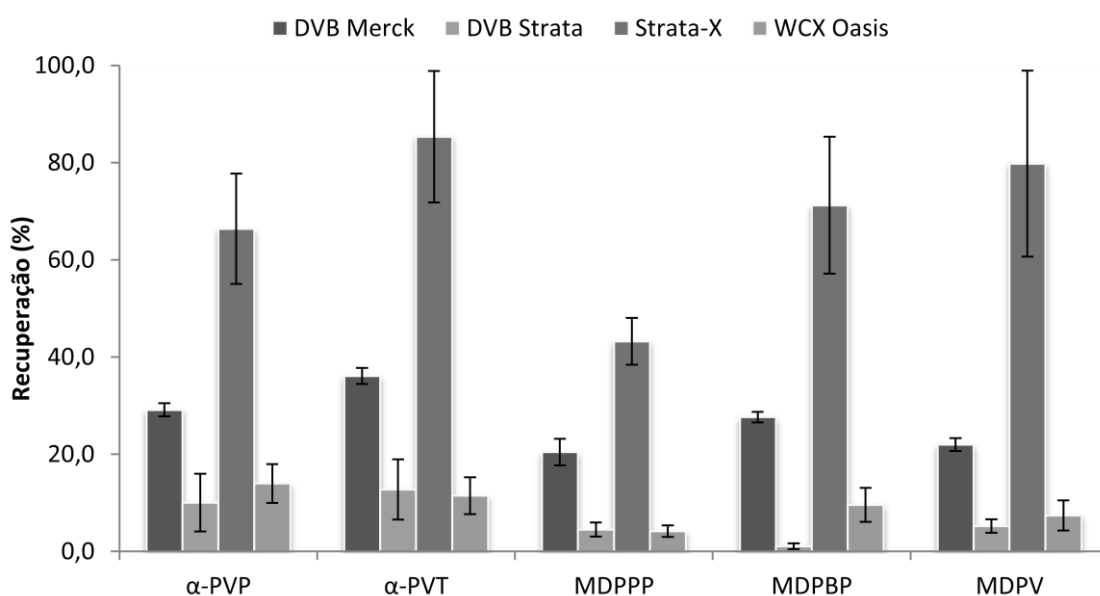


Figura 3.7 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes materiais poliméricos testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 16 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH, 30 min sob tratamento ultrassónico].

Após a avaliação dos sete polímeros testados, foi possível observar que apenas quatro conseguiram extrair os compostos alvo com valores significativos. O polímero Starta-X foi o único que conseguiu realizar a extração dos compostos apresentando valores de recuperação $\geq 43\%$ e $RSD \leq 24\%$.

Durante a etapa de escolha do melhor sorvente a utilizar durante a extração, foi claramente observado que os compostos apresentam valores de RSD bastante elevados quando analisados por GC-MS, tendo este fato sido descrito por alguns autores [1].

Tendo em consideração os sorventes testados, verifica-se que os analitos conseguem ser recuperados com sucesso recorrendo a materiais poliméricos, permitindo concluir que o uso de sorventes que atuam com base em interações de fase reversa (retendo os analitos com recurso a ligações π - π , pontes de hidrogénio e/ou interações hidrofóbicas) poderão ser bastante úteis para a extração de cationas sintéticas de matrizes aquosas [11].

De entre os polímeros estudados destaca-se o MCX Oasis, que ao contrário do esperado não recuperou nenhum dos analitos em estudo. De acordo com a literatura disponível, o polímero MCX Oasis foi utilizado como polímero extrator para o desenvolvimento de uma metodologia analítica na determinação de cationas sintéticas em saliva, apresentando recuperações elevadas nomeadamente para o MDPV ($\geq 92,9\%$) e para o α -PVP ($\geq 88,1\%$) [12]. Contudo, importa referir que a metodologia usada pelos autores é com recurso a SPE e análise efetuada por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC). Para além disso, os autores relatam que foram adicionados 300 μ L de ácido fosfórico (4 %) às amostras, permitindo concluir assim que o pH poderá ser o responsável pelo fraco desempenho do polímero MCX Oasis no presente trabalho, uma vez que este sorvente é um co-polímero à base de divinilbenzeno e pirrolidona de troca catiónica.

O polímero Strata-X foi selecionado como o melhor fase a utilizar para a extração dos compostos em estudo, tendo em consideração as recuperações obtidas e os valores de RSD obtidos durante os ensaios realizados. As interações de fase reversa [11] que ocorrem entre o anel de pirrolidina do polímero e os anéis de pirrolidina dos compostos para o valor de pH do meio, poderão ser o principal fator de sucesso para os valores de recuperação obtidos. O polímero Strata-X já foi anteriormente proposto para extração de cationas sintéticas utilizando a metodologia SPE/LC-MS/MS [13].

3.2.2. Otimização das etapas de retroextração

A retroextração, ou também denominada etapa de dessorção, consiste na transferência dos analitos da fase sorvente para o sistema instrumental, neste caso GC-MS [10, 14].

Para a realização deste trabalho experimental foi determinado que os parâmetros que podem influenciar a dessorção líquida, durante a análise são o tipo de solvente e o tempo de retroextração.

3.2.2.1. Tipo de solvente a utilizar durante a retroextração

O tipo de solvente de retroextração, deverá ser um dos parâmetros a otimizar durante o desenvolvimento analítico da metodologia BAμE, uma vez que o solvente deverá reunir características que permitam quebrar as interações entre o sorvente extrator e os analitos, permitindo a transferência destes para a fase orgânica [10].

Tendo em consideração, que as catinonas sintéticas poderão produzir uma resposta instrumental diferente, consoante as interações solvente-*liner*-analito, as recuperações obtidos foram realizadas em comparação com um padrão dos analitos num solvente correspondente.

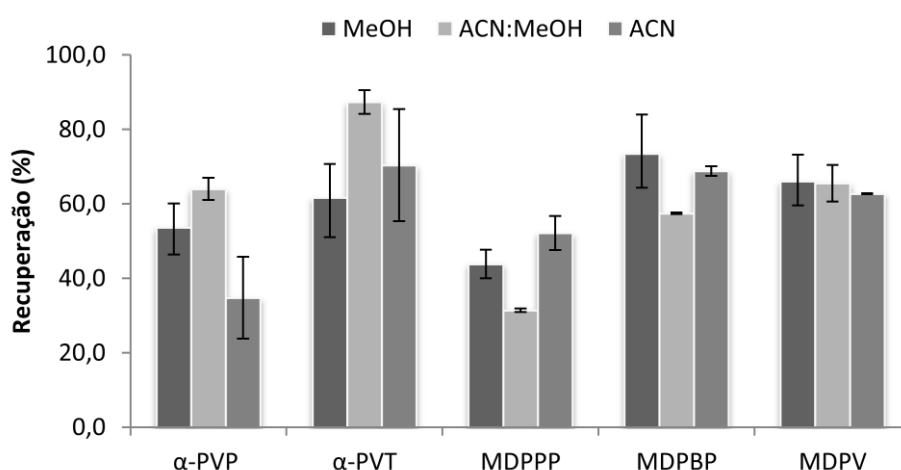


Figura 3.8 - Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes solventes extratores testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 16 h (990 rpm); pH 5,5; retroextração: 30 min sob tratamento ultrassónico].

Foram testados como solventes extratores o ACN, MeOH e uma mistura de ACN:MeOH (50:50, v:v). Dos estudos efetuados, a mistura de ACN:MeOH (50:50, v:v) demonstrou melhores recuperações para os analitos: α -PVP, α -PVT e MDPV. Sendo o α -PVP e o MDPV os analitos com maior interesse, do ponto de vista forense, a mistura ACN: MeOH (50:50, v:v) foi selecionada como solvente de dessorção para os estudos posteriores. Adicionalmente, determinou-se que o padrão referência deveria ser preparado em ACN:MeOH (50:50; v:v) para a continuidade do trabalho.

3.2.2.2. Tempo de retroextração

A retroextração, compreende o estudo da transferência dos analitos da fase sorvente para o sistema GC-MS. Durante a retroextração, é necessário ter em conta que o tempo de atuação seja suficiente para garantir a máxima retroextração dos analitos da fase sorvente. Neste trabalho, estudou-se o efeito da retroextração ao fim de 15, 30, 45 e 60 minutos sob tratamento ultrassónico usando ACN:MeOH (50:50, v:v) como solvente extrator.

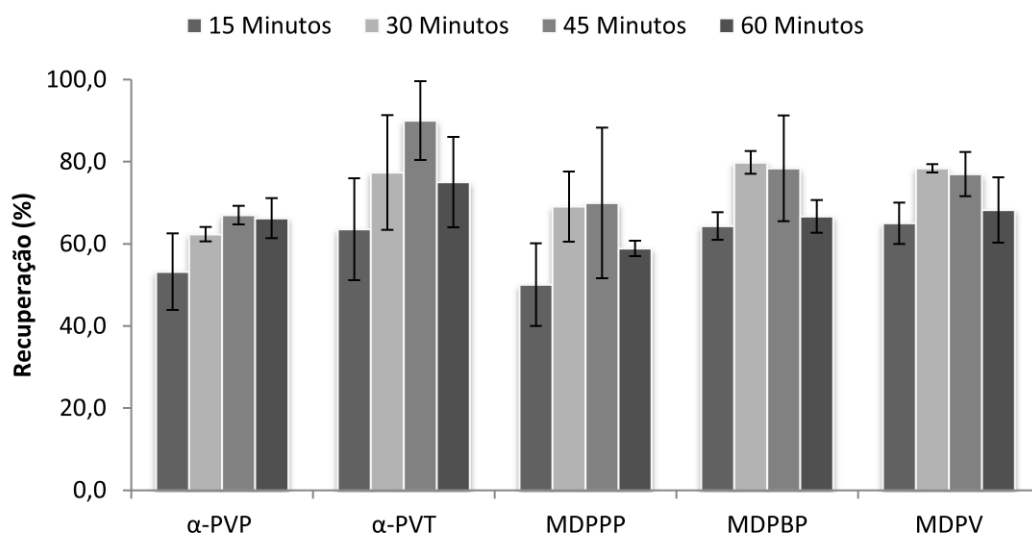


Figura 3.9 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes tempos de retroextração testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 μ g/L; extração: 16 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v)].

Utilizando 15 minutos como tempo de retroextração os compostos apresentam valores de RSD elevados, como é o caso do α -PVP, α -PVT e MDPPP que apresentam os valores 17,5 %, 19,5 % e 20,1 %, respetivamente. Assim, excluiu-se a possibilidade de utilizar 15 minutos de tempo de retroextração para os compostos de interesse.

Quando se compara a utilização de 30 minutos de retroextração com os 45 minutos, existem poucas diferenças. Contudo, importa salientar que a recuperação dos compostos tem tendência a aumentar com o tempo de retroextração, embora com valores de RSD ligeiramente superiores.

Seria expetável que a recuperação utilizando 60 minutos de tempo de retroextração fosse superior, embora este fato não se tenha verificado. Duas possibilidades poderão estar na origem do resultado: i) os compostos sofrem degradação térmica devido ao tempo de exposição ao ultrassons; ii) o dispositivo BA μ E sofre degradação, afetando a recuperação dos compostos.

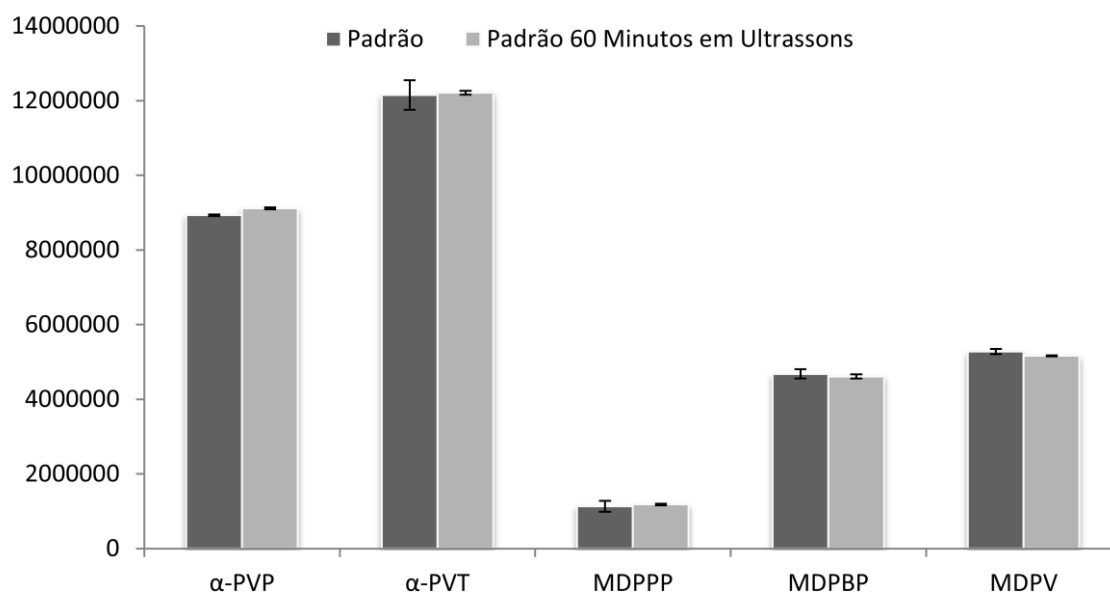


Figura 3.10 - Comparação entre a resposta instrumental obtido entre uma solução-padrão sujeita a um período de 60 minutos sob tratamento ultrassónico e uma solução-padrão não sujeita a este tipo de tratamento analisadas em duplicado; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM).

De modo a verificar a estabilidade dos compostos sob tratamento ultrassônico, duas soluções padrão foram sujeitas a um período de 60 minutos em ultrassons, sendo posteriormente comparados com a resposta instrumental obtida de um padrão não sujeito a este tipo de tratamento e a mesma concentração. Os resultados obtidos, ilustrados na figura 3.10, demonstram que o padrão não sofre qualquer degradação significativa que justifique os resultados obtidos, podendo indicar que o dispositivo BAμE poderá sofrer degradação, afetando as recuperações obtidas.

Consequentemente, o tempo de retroextração selecionado para prosseguir os estudos foi de 45 minutos.

3.2.3. Otimização das etapas de extração

Durante a etapa de extração, ocorre a transferência dos analitos da matriz para a fase extratora [10]. De modo a otimizar este processo, diversos parâmetros deverão ser estudados, nomeadamente os efeitos da velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, pH do meio, modificador orgânico e força iônica.

3.3.3.1. Efeito da velocidade de agitação

O primeiro parâmetro testado para a otimização do processo de extração foi a velocidade de agitação. A velocidade de agitação promove a transferência/difusão dos analitos presentes na matriz para a fase extrativa do dispositivo BAμE. A velocidade de agitação tem como objetivo acelerar o processo de difusão e, simultaneamente, assegurar a estabilidade da flutuação do dispositivo BAμE.

Como se pode observar na figura 3.11, os valores de recuperação dos analitos tendem a apresentar maiores desvios com o aumento da velocidade de agitação.

Com o objetivo de obter menores desvios para cada um dos analitos e uma melhor recuperação do MDPPP, foi selecionada a utilização de uma velocidade de agitação de 750 rpm.

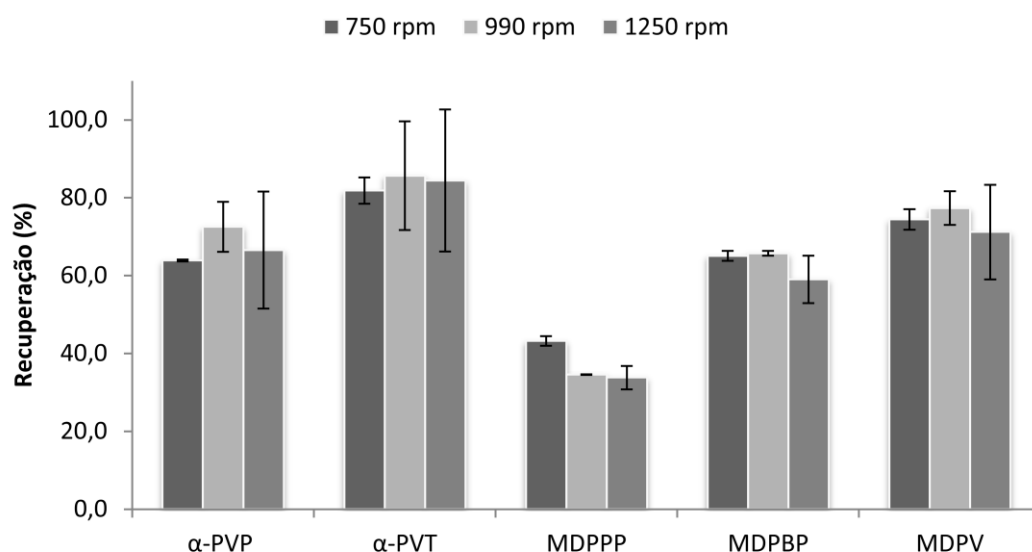


Figura 3.11 – Recuperação média obtida dos analitos para as diferentes velocidades de agitação testadas; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 16 h; pH 5,5; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v), 45 min sob tratamento ultrassônico].

3.2.3.2. Efeito do tempo de equilíbrio

O valor de recuperação obtido é dependente do tempo que se demora a alcançar o equilíbrio de extração entre as duas fases. Na realidade, o tempo de equilíbrio pode ser traduzido, como o tempo que cada analito demora a ser extraído da matriz para a fase extrativa.

De modo a estudar este parâmetro, realizaram-se ensaios laboratoriais com períodos de extração de 1, 2, 3 e 16 horas.

Tendo em consideração os resultados obtidos, demonstrados na figura 3.12, a extração de 16 horas apresentou um melhor desempenho, revelando que a retenção destes compostos pode ser caracterizada por um comportamento cinético lento, isto é, apresentam coeficientes de difusão reduzidos, necessitando de maior tempo para atingir o equilíbrio.

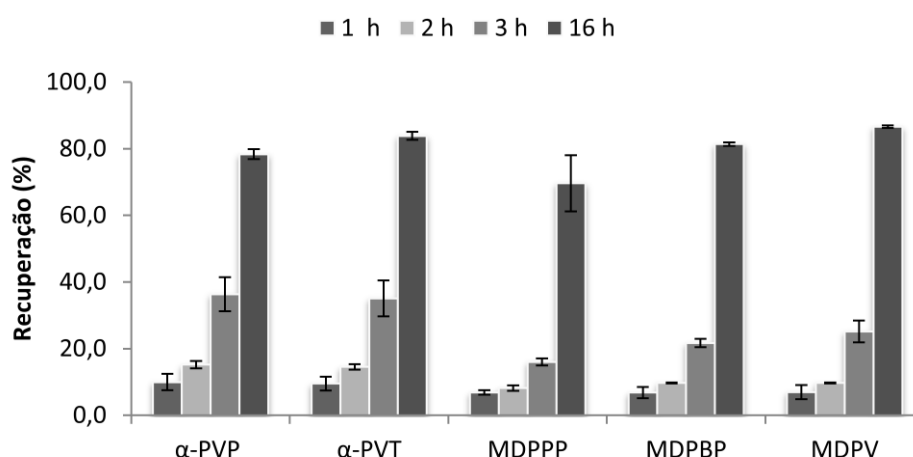


Figura 3.12 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes tempos de extração testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 750 rpm; pH 5,5; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v), 45 min sob tratamento ultrassônico].

Apesar da metodologia permitir que os compostos sejam extraídos num período de tempo consideravelmente longo, esta abordagem apresenta a vantagem de poder ser realizada durante a noite, sem necessidade de manipulação.

3.2.3.3. Efeito do pH

O controlo do pH da matriz permite a ionização dos analitos e consequentemente a modificação das condições da amostra, podendo influenciar os equilíbrios estabelecidos durante o processo de extração. Neste sentido, variou-se o pH, por forma a determinar qual o valor que terá maior influência na recuperação dos analitos em questão. Foram selecionados valores de pH básico (pH 12), ácido (pH 2) e neutro (pH 5,5).

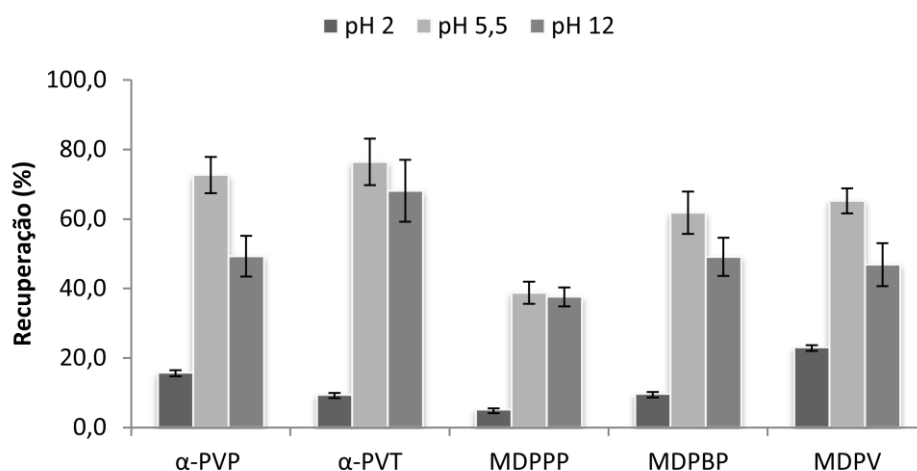


Figura 3.13 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes valores de pH do meio; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 16 h (750 rpm); retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v) 45 min sob tratamento ultrassônico].

De acordo com os dados obtidos e demonstrados na figura 3.13, podemos concluir que os analitos apresentam valores de recuperação superiores quando o pH do meio é igual a 5,5.

Pela observação os resultados obtidos e os valores de pK_a dos compostos em estudo (entre 6,1 e 8,9), podemos concluir que durante este ensaio, a eficiência da extração parece ser afetada, tendo em consideração o equilíbrio (vial de amostragem-analitos). Para determinados valores de pH, os analitos poderão ser adsorvidos nas paredes de vidro dos frascos de amostragem (*wall-effect*).

3.2.3.4. Efeito do modificador orgânico

As metodologias de extração baseadas em sorção estática, tem a desvantagem de sofrer um fenómeno denominado de *wall-effect*. Este fenómeno traduz-se na adsorção dos analitos à parede de vidro dos frascos de amostragem, resultando na diminuição da eficiência da extração [10]. De modo a reduzir os efeitos deste fenómeno, é comum adicionar-se MeOH como modificador orgânico da matriz aquosa. No entanto, a adição

deste aumenta a adição de solutos na fase aquosa, podendo reduzir a eficiência do processo de extração.

Foram realizados ensaios com adição de 0, 10 e 20% em MeOH (v/v), de modo a verificar se este fenómeno afeta ou não as recuperações dos analitos em estudo.

De acordo com os resultados obtidos (figura 3.14), podemos concluir que para os analitos em estudo a adição de MeOH, se traduz numa redução da eficiência do processo de extração. Os resultados demonstram que os compostos, pela adição de MeOH na matriz, vão aumentar a afinidade dos analitos para a matriz, indicando que os analitos possuem um valor baixo de $\log K_{O/W}$. Com recurso ao software *Chemanaliser* verificou-se que os valores de $\log K_{O/W}$ dos analitos se situam entre 2,2 e 2,9.

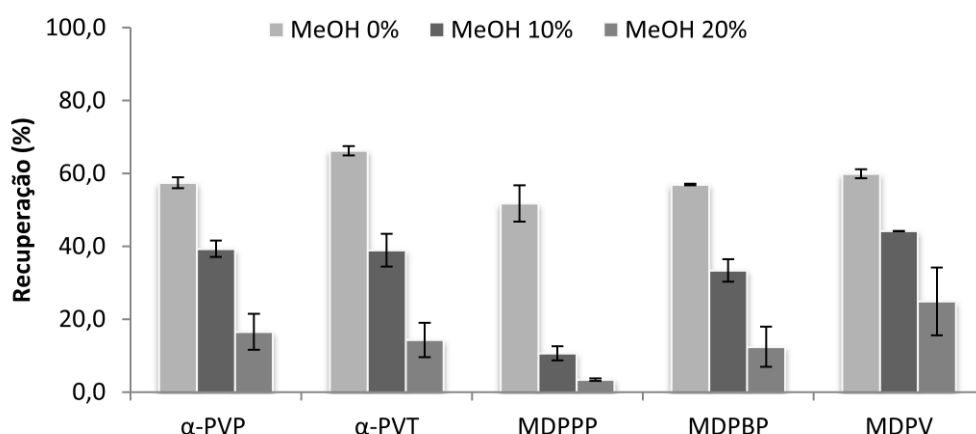


Figura 3.14 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes níveis de MeOH orgânico testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 750 rpm; pH 5,5; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v), 45 minutos sob tratamento ultrassónico].

3.2.3.5. Efeito da força iônica

Para compostos com um baixo valor de $\log K_{O/W}$, a adição de NaCl aumenta a eficiência de extração, pelo efeito denominado de *salting out* [10]. Assim, o efeito da força iônica na recuperação dos analitos foi estudado por adição de 10 e 20 % (*m/v*) de NaCl à matriz aquosa.

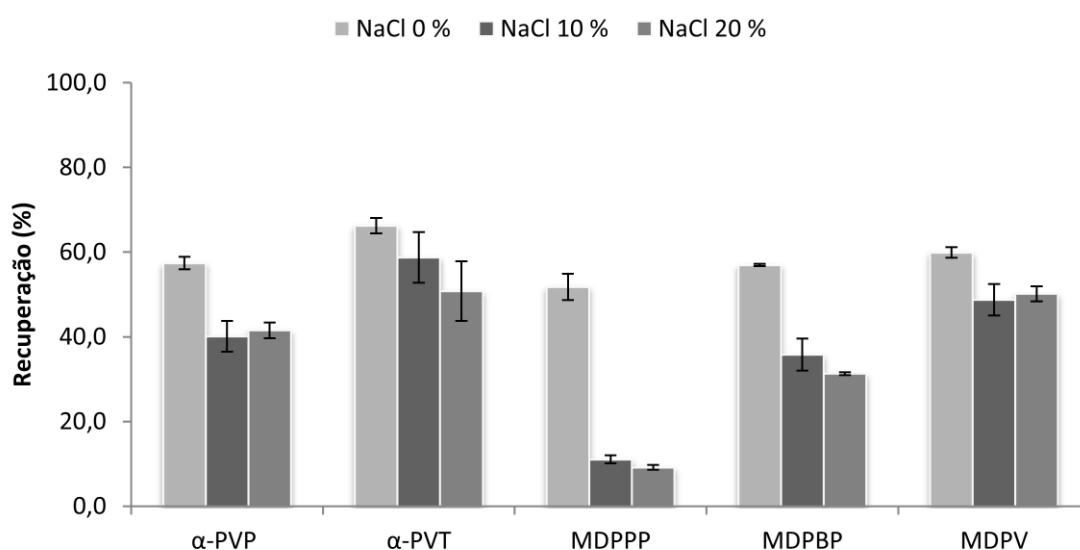


Figura 3.15 – Recuperação média obtida dos analitos para os diferentes níveis de NaCl testados; análise efetuada por LVI-GC-MS(SIM) [Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 4 µg/L; extração: 750 rpm; pH 5,5; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v); 45 minutos sob tratamento ultrassônico].

Como é possível verificar, pelos resultados obtidos na figura 3.15, e contrariamente ao esperado, o aumento da adição de sal diminui a eficiência do processo de extração para os analitos em estudo. Contudo, este fenómeno foi igualmente observado em trabalhos anteriores [15]. Na realidade, a adição de NaCl, poderá provocar uma diminuição da eficiência de extração para compostos com características polares, uma vez que o sal poderá competir com os analitos na ocupação da área superficial da fase sorvente.

Claramente, a adição de NaCl demonstrou afetar negativamente a eficiência da extração dos analitos em estudo e assim desprezou-se este parâmetro para a continuidade do trabalho.

A conclusão da otimização dos parâmetros para a metodologia BA μ E, permitiu assim elucidar sobre as melhores condições para a extração e retroextração das cationonas sintéticas. As condições, encontram-se descritas na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Condições experimentais otimizadas para a metodologia BA μ E-LD.

Condições Experimentais Otimizadas para Metodologia BAμE-LD	
Fase Extratora	Strata-X
Solvente de Retroextração	ACN:MeOH (50:50 ; v:v)
Tempo de Retroextração	45 min sob tratamento ultrssónico
Velociadade de Agitação	750 rpm
Tempo de Equilíbrio	16 h
pH da Matriz	pH 5,5
Adição de MeOH	-
Adição de NaCl	-

3.3. Adequação para um Método de Despistagem de Catinonas Sintéticas em Amostras de Saliva

Após, encontrar as melhores condições para a extração e retroextração das catinonas sintéticas, verificou-se que os compostos ao longo do tempo vão produzindo respostas instrumentais dispare, isto é, ao longo do tempo a precisão instrumental associada a análise dos compostos em estudo, vai sendo afetada. Este fenômeno poderá estar correlacionado, com a degradação verificada e estudada *a priori*, durante a otimização das condições instrumentais.

De modo a obter mais informações sobre este fenômeno, alterou-se a metodologia de injeção usada, optando-se pelo modo *splitless*, onde menores volumes de injeção são usados.

Utilizando o modo *splitless* e verificando a presença dos produtos de degradação para todos os analitos em estudo, realizou-se novamente um estudo de linearidade. A mesma foi obtida a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura inicial (10000,0 µg/L).

Conforme é possível verificar na tabela 3.5, as catinonas sintéticas contendo um grupo um grupo 3,4-metilenodioxo adicionado ao anel benzeno na sua estrutura química, aparentam sofrer degradação no *liner* mais facilmente, produzindo uma resposta instrumental com uma linearidade mais baixa.

Tabela 3.5 – Linearidade dos analitos analisados por GC-MS(SIM), utilizando *splitless* como modo de injeção e na presença de produtos de degradação.

Catinona Sintética	Linearidade dos Analitos	
	Gama de Linearidade (µg/L)	r^2
α -PVP	100,0 – 10000,0	0,980
α -PVT	100,0 - 10000,0	0,978
MDPPP	800,0 - 10000,0	0,904
MDPBP	100,0 - 10000,0	0,954
MDPV	100,0 - 10000,0	0,919

Apesar de não se ter realizado um estudo de precisão instrumental mais abrangente, registou-se que para um mesmo valor de concentração (7000 µg/L) o α -PVP apresentou um RSD de 26,7 %.

Após os resultados observados na figura 3.5, verifica-se que a degradação causada pelas condições de injeção, afeta a linearidade dos compostos em estudo de um modo muito significativo, influenciando de forma incerta para cada um dos compostos.

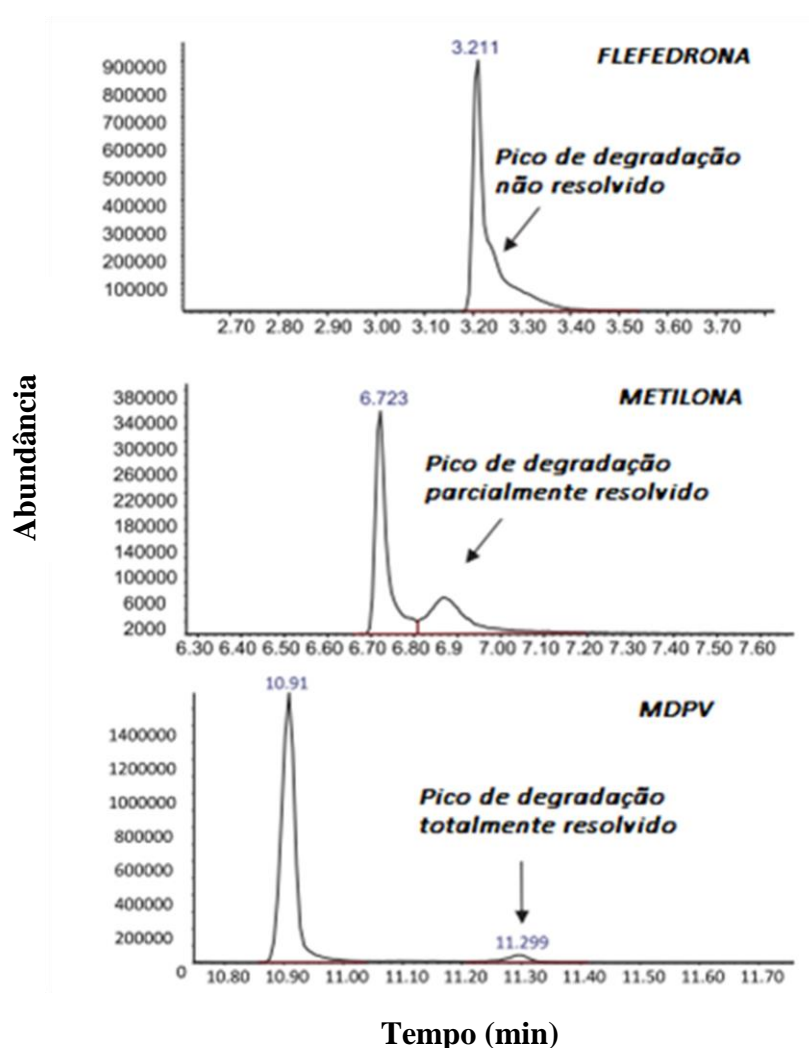


Figura 3.16 – Pico de degradação da Metilona, Flefedrona, MDPV e os seus respetivos produtos de degradação. Adaptado de [1].

Na realidade, estudos recentes, relativos ao estudo da degradação associada a este grupo de compostos, revelaram que a reação de degradação se vai manifestar de maneiras bastante distintas para diferentes catinonas sintéticas durante a análise por GC-MS. Assim, dependendo da catinona sintética, podemos ter a presença de um pico de degradação completamente resolvido do pico do analito, um pico de degradação parcialmente resolvido ou um pico de degradação não resolvido (figura 3.16) [1, 16].

Contudo, nenhum estudo esclarece, se os diferentes tipos de manifestação ao nível cromatográfico, advêm da estrutura química de cada catinona sintética ou se existe algum fator em termos de quantidade de analito injetado/concentração de analito.

O modo como a degradação, causada pelas condições de injeção, pode afetar a linearidade das catinonas sintéticas e a sua quantificação foi evidenciada durante a síntese da metacatinona e algumas substâncias análogas em 1994 [17]. Os autores, evidenciam que a degradação destes compostos, representa um problema analítico, uma vez que estes podem, sob determinadas condições cromatográficas, sofrer co-eluição com os respetivos produtos de degradação e produzir um espectro de massa híbrido.

Neste sentido, tendo em consideração os resultados descritos anteriormente, não se conseguiram reunir as condições ideais para desenvolver uma metodologia analítica que permita a quantificação exata de catinonas sintéticas em matrizes biológicas. No entanto, poder-se-ia desenvolver uma metodologia de despiste qualitativa/semi-quantitativa para os compostos em estudo, utilizando o modo de injeção *splitless*, para o MDPV, α -PVP e α -PVT. Para este propósito, a saliva foi selecionada como matriz biológica.

3.3.1 – Linearidade da resposta instrumental e limites de deteção (LODs)

De modo a desenvolver uma metodologia de despiste de catinonas sintéticas, utilizando o modo *splitless* como modo de injeção, procedeu-se a substituição do *liner*, por forma a evitar a degradação dos compostos.

Avaliou-se o LOD, assim como a linearidade e a precisão instrumental, associadas as novas condições (Tabela 3.6), para cada um dos compostos. O LOD foi obtido a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura inicial (10000,0 $\mu\text{g/L}$), até

se obter uma razão S/N de 3/1. Simultaneamente, a linearidade instrumental foi estabelecida, usando seis níveis de diluição da solução inicial analisados em triplicado, de modo a obter a precisão instrumental para cada nível de concentração.

As concentrações selecionadas para estudar a linearidade da resposta instrumental tiveram por base o conhecimento da capacidade de concentração da metodologia BAμE, o volume máximo de amostra que se tencionava usar (0,5 mL) e a concentração expetável em saliva (500 μg/L), associada ao consumo destas substâncias.

Tabela 3.6 - Precisão instrumental (RSD), limite de detecção (LOD), gama de linearidade e coeficiente de determinação (r^2), tempos de retenção (t_R) das três catinonas sintéticas em estudo, obtidos por GC-MS nas condições instrumentais otimizadas.

Catínonas Sintéticas	t_R (min)	Íões SIM (m/z)	Limite de Detecção (μg/L)	Linearidade		
				Gama de Concentração (μg/L)	r^2	Precisão Instrumental
α-PVP	8,9	126, 77, 105	100	500-20000	0,987	≤ 11,0
α-PVT	9,2	126, 111, 84	100	500-20000	0,985	≤ 10,5
MDPV	12,2	126, 121, 149	100	500-20000	0,996	≤ 18,5

Curiosamente, os valores de precisão instrumental registados foram semelhantes aos encontrados nos estudos realizados anteriormente no modo de *solvent vent*.

De modo a se obter uma maior seletividade na identificação dos analitos, foram seguidos os critérios propostos pela WADA (*World Anti-Doping Agency*) [18] para identificação qualitativa em ensaios realizados por GC-MS. Foi necessário proceder a análise das abundâncias relativas dos dois íões selecionados como secundários para cada analito e o respetivo pico base, de modo a aumentar a sensibilidade e identificar inequivocamente os analitos. Os resultados encontram-se descritos na tabela 3.7, assim como a tolerância máxima permitida para este parâmetro. Relativamente ao t_R , admitiu-se que a diferença entre o valor obtido na amostra não poderia ultrapassar a $\pm 0,1$ minutos em comparação com o tempo médio de retenção dos padrões de referência.

Tabela 3.7 – Pico base, fragmentos *target* com a abundância relativa de cada um ao pico base respectivo e a tolerância máxima permitida para a identificação inequívoca de cada composto.

Catióna Sintética	Pico base (m/z)	Fragmentos <i>target</i> (m/z)	Abundância relativa (%)	Tolerância máxima [18]	Gama de tolerância (%)
α-PVP	126	77	6,4	5% Absoluto	[1,4 – 11,4]
		105	4,8	50% Relativo	[2,4 – 7,2]
α-PVT	126	111	6,8	5% Absoluto	[1,8 – 11,8]
		84	3,7	50% Relativo	[1,8 – 5,5]
MDPV	126	121	3,6	50% Relativo	[1,8 – 5,5]
		149	6,1	5% Absoluto	[1,1 – 11,1]

Após a definição dos critérios de tolerância, avaliou-se a eficiência da extração BA μ E, e o desempenho da metodologia para despistagem, em termos de seletividade e de capacidade identificação.

3.3.2. Avaliação da eficiência de extração utilizando a metodologia BA μ E-LD/GC-MS(SIM) em amostras aquosas e saliva

De modo a avaliar a eficiência da extração, utilizou-se as condições otimizadas anteriormente, e realizou-se ensaios em amostras de água e saliva.

Para os ensaios em água foi utilizada água ultra-pura fortificada com 100 μ L de uma solução padrão (2500 μ g/L) de modo a obter-se uma concentração final de 10 μ g/L no vial de amostragem. A análise foi aplicada em condições de repetibilidade ($n=5$).

Para saliva, foi idealizada a mesma metodologia. Uma amostra de saliva foi recolhida aleatoriamente de um indivíduo, fortificada após centrifugação, utilizando a mesma solução padrão (2500 μ g/L). Assim, a saliva passou a conter 500 μ g/L dos analitos em estudo. Recolheu-se 0,5 mL da saliva fortificada e foi inserida num vial de amostragem devidamente preparado com 24,5 mL de água ultra-pura.

Tabela 3.8 - Recuperação obtida em 25 mL de água ultra-pura fortificada com 10 µg/L e recuperação obtida em 24,5 mL de água ultra-pura + 500 µL de saliva fortificada.

Catinona Sintética	Recuperação obtida em 25 mL de água ultra-pura fortificada a 10 µg/L (\pm RSD) (n=5)	Recuperação obtida em 24,5 mL de água ultra-pura + 500 µL de saliva fortificada (Fortificação final de 10 µg/L) (\pm RSD) (n=5)
α -PVP	60,1 \pm 12,0	43,1 \pm 13,2
α -PVT	69,7 \pm 13,4	63,7 \pm 10,8
MDPV	64 \pm 16,6	52,3 \pm 13,6

Os resultados apresentados na tabela 3.8 demonstram recuperações semelhantes às encontradas nas etapas finais do processo de otimização da microextração. A técnica de extração permitiu recuperações médias para água, compreendidas entre 60,1 e 69,7 %. Contudo, no caso das amostras de saliva estas recuperações médias são afetadas por efeitos de matriz tendo-se obtido valores compreendidos entre 43,1 e 63,7 %. Conforme o esperado, os valores de RSD foram elevados nos dois casos ($\geq 10,8$ % no caso da saliva; $\geq 12,0$ % no caso da água), no entanto as diferenças observadas entre as duas matrizes não parecem ser significativas.

3.3.3. Seletividade e capacidade de identificação da metodologia desenvolvida para o despiste de catinonas sintéticas em saliva

A seletividade é considerada a capacidade que um método analítico possui para identificar e diferenciar o analito de interesse numa matriz complexa sem interferência de outros compostos que possam estar presentes na amostra. Este parâmetro, por vezes, pode ser denominado por especificidade [19].

Por sua vez, a capacidade de identificação, pode ser definida como a capacidade de identificar os analitos inequivocamente.

De modo a testar estes dois parâmetros, saliva foi recolhida de diferentes indivíduos (5 do sexo feminino e 5 do sexo masculino), que não tinham consumido nenhum tipo de substâncias psicoativas nas 12 horas anteriores.

As 10 amostras recolhidas, foram analisadas em duplicado utilizando a metodologia desenvolvida BA μ E-LD/GC-MS(SIM). Todas as 10 amostras analisadas, não apresentavam nenhum pico cromatográfico para o tempo de retenção dos analitos alvo (MDPV, α -PVP e α -PVT). Neste sentido, podemos afirmar que para a metodologia desenvolvida, a percentagem de falsos negativos foi nula.

De modo a testar a capacidade de identificar os analitos em saliva, recolheram-se 5 amostras provenientes de indivíduos diferentes, escolhidos aleatoriamente, que afirmaram não ter consumido nenhum tipo de substância psicoativa nas últimas 12 horas. As 5 amostras de saliva foram fortificadas utilizando uma solução, contendo os analitos em estudo a uma concentração de 2500,0 μ g/L, sendo que a concentração final dos analitos nas amostras de saliva foi de 500,0 μ g/L.

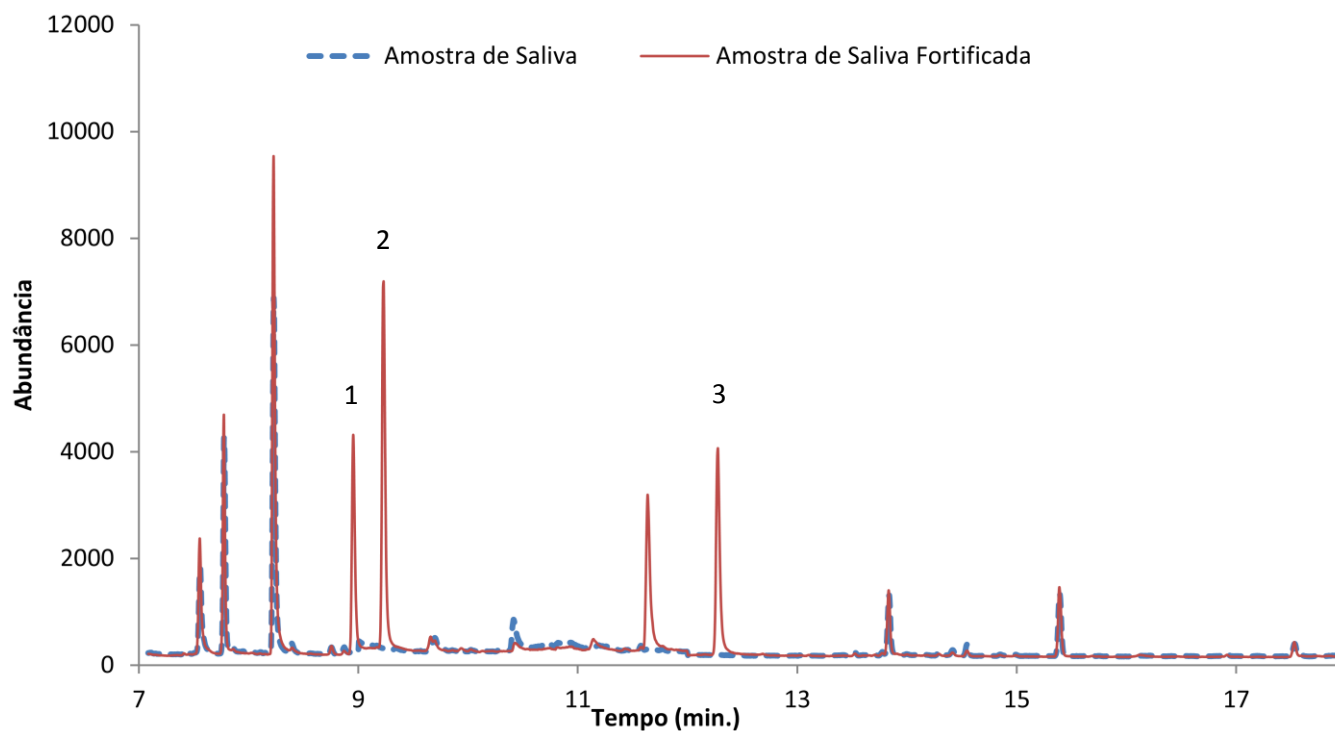
Procedeu-se a análise das salivas fortificadas, em duplicado, utilizando a metodologia BA μ E-LD/GC-MS(SIM) desenvolvida. Por observação da tabela 3.9, verificou-se que o MDPV, o α -PVP e o α -PVT foram detetados em todas as salivas fortificadas demonstrando concordância com os critérios de tolerância definidos na tabela 3.7.

Outros estudos poderiam ser realizados de modo a testar a seletividade da metodologia em identificar os analitos na matriz, recorrendo a fortificação com outras substâncias psicoativas, dando mais informações sobre a capacidade da metodologia desenvolvida originar falsos positivos. No entanto, a falta de recursos, nomeadamente padrões, não tornou possível a realização dessa tarefa.

A figura 3.17, demonstra a diferença entre um cromatograma de uma amostra de saliva fortificada e não fortificada, onde se observa que a metodologia proposta apresenta boa seletividade e sensibilidade na despistagem de catinonas sintéticas neste tipo de matrizes.

Tabela 3.9 – Resultados obtidos de cinco amostras de saliva fortificadas, analisadas em duplicado por BAμE-LD/GC-MS(SIM).

Catióna Sintética	Parâmetros	Amostra F1	Amostra F2	Amostra F3	Amostra F4	Amostra F5
α-PVP	Tempo de retenção (min)	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9
	Presença do pico base	126	126	126	126	126
	Abundância relativa média (m/z 77)	7,6	7,7	7,9	8,6	7,4
	Abundância relativa média (m/z 105)	6,1	6,1	6,4	6,8	5,8
α-PVT	Tempo de retenção (min)	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
	Presença do pico base	126	126	126	126	126
	Abundância relativa média (m/z 84)	4,2	4,3	4,8	5,1	4,4
	Abundância relativa média (m/z 111)	6,6	7,6	8,1	7,6	7,3
MDPV	Tempo de retenção (min)	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2
	Presença do pico base	126	126	126	126	126
	Abundância relativa média (m/z 121)	3,9	4,2	4,0	4,8	4,1
	Abundância relativa média (m/z 149)	5,6	5,6	5,3	6,5	5,6

**Figura 3.17** – Cromatograma obtido de uma amostra de saliva fortificada (500 µg/L) e uma amostra de saliva não fortificada, análise efetuada por BAμE-LD/GC-MS(SIM) [1- α-PVP; 2- α-PVT; 3- MDPV].

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O presente trabalho propõe uma metodologia analítica alternativa, BA μ E-LD/GC-MS(SIM), para a despistagem de catinonas sintéticas (α -PVP, α -PVT e MDPV) em saliva.

Numa primeira etapa, estudou-se o comportamento de um grupo de catinonas sintéticas, estruturalmente diferentes entre si (metilona, α -PVP, α -PVT, MDPPP, MDPBP e MDPV) por GC-MS. Verificou-se que os compostos tendem a sofrer degradação no *liner* durante a injeção no sistema cromatográfico. A utilização de um *liner* novo, não contendo pontos ativos, demonstrou inibir a reação de degradação para os compostos que possuem na sua estrutura química um anel de pirrolidina (α -PVP, α -PVT, MDPPP, MDPBP e MDPV). As condições cromatográficas, utilizando um injetor PTV (*solvent vent*) com temperatura programada final de 300°C foram testadas de modo a garantir que a metodologia era adequada.

Posteriormente, procedeu-se a otimização da metodologia BA μ E. O polímero Strata-X, destacou-se como o melhor sorvente para a extração destes compostos e a mistura ACN:MeOH (50:50; v:v) sob tratamento ultrassónico (45 min), permitiu uma melhor dessorção dos analitos da fase extratora. As condições otimizadas para extrair as catinonas sintéticas foram: 16 h de tempo de equilíbrio (750 rpm) e pH 5,5.

Durante o decorrer das etapas de otimização, verificou-se que a precisão instrumental associada à análise dos compostos em estudo vai sendo afetada ao longo do tempo. Ao se optar por injetar os compostos no modo *splitless*, concluiu-se que na presença da degradação, a linearidade dos compostos em estudo é condicionada, sendo principalmente afetados os compostos que apresentam na sua estrutura química um grupo 3,4-metilenodioxo adicionado ao anel benzeno.

Tendo em consideração que não se conseguiu reunir as condições instrumentais necessárias que permitissem a quantificação dos analitos em estudo, desenvolveu-se uma metodologia de despistagem para identificação do MDPV, α -PVP e α -PVT em saliva, utilizando o modo de injeção *splitless*.

Após a substituição do *liner*, a metodologia BA μ E-LD/GC-MS(SIM) desenvolvida permitiu a resolução dos três compostos num tempo analítico inferior a 18 min, apresentando LODs de 100,0 μ g/L, razoável precisão instrumental ($RSD \leq 18,5\%$) e boa linearidade de resposta ($r^2 > 0,985$) na gama de trabalho compreendida entre

500,0 e 20000,0 $\mu\text{g/L}$. A metodologia de extração permitiu recuperações de 43,1 (\pm 13,2), 63,7 (\pm 10,8), 52,3 (\pm 13,6) para o α -PVP, α -PVT e MDPV, respetivamente.

A metodologia proposta foi aplicada em amostras de saliva, matriz biológica cuja colheita é considerada não evasiva e pode ser efetuada de forma simples e acompanhada, de modo a evitar a sua adulteração. O bom desempenho em termos de seletividade e a boa capacidade de identificação dos analitos, sugerem que esta metodologia pode ser adotada para confirmar a veracidade dos inquéritos realizados para estudos de consumo deste tipo de substâncias.

Numa perspetiva futura, pode sugerir-se a implementação desta metodologia a outras catinonas sintéticas, ou até mesmo, adotar a metodologia de microextração a cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa ou a outro tipo de detetor, e proceder a uma análise quantitativa.

Por último, a injeção *on column* (injeção fria), poderá ser igualmente testada, pois aparenta ser uma solução viável para a análise quantitativa de compostos termolábeis, tendo em consideração que, neste modo de injeção, os analitos não interagem com o *liner*, sendo diretamente introduzidas na coluna.

Considerações Finais

A análise de substâncias de abuso tornou-se um tema popular nas últimas décadas. No entanto, apesar dos avanços proporcionados pela descoberta de novas tecnologias, a análise destes compostos apresenta, por vezes, desafios analíticos que são difíceis de ultrapassar. As metodologias ideais, deverão ser capazes de identificar os compostos inequivocamente, uma vez que estes estão ao abrigo de legislações rigorosas, não deixando espaço para a “dúvida razoável”. Assim, graças aos avanços instrumentais proporcionados pelo avanço da tecnologia, o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação e quantificação vestigial de substâncias de abuso tem aumentado exponencialmente na literatura.

O aparecimento de novas substâncias de abuso, denominadas de NPS's, tem-se revelado um grave problema de saúde pública, incentivando assim a comunidade científica a investir em novas metodologias que sejam capazes de responder aos desafios analíticos levantados por este fenómeno. Apesar de a toxicologia forense/clínica se encontrar em grande desenvolvimento é de extrema importância que os laboratórios forenses/clínicos continuem a investir no desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de compostos prioritários em amostras biológicas.

Considera-se igualmente importante, investir no desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostra, tendo em consideração que esta é uma etapa essencial no que se refere ao tópico das substâncias de abuso. Os novos compostos, que surgem no mercado, tendem a produzir os mesmos efeitos farmacodinâmicos em concentrações inferiores, assim como existe a necessidade de identificar estes compostos noutra tipo de matrizes, para além das matrizes biológicas, como por exemplo matrizes alimentares e matrizes ambientais (ex. águas residuais).

Parte I - Identificação e Quantificação de Substâncias de Abuso em Molho de Soja Adulterado

Referências da Introdução:

- [1] L. Manning and J. M. Soon, “Developing systems to control food adulteration”, *Food Policy*, vol. 49, no. P1, pp. 23–32, 2014.
- [2] C. S. Tang and V. Babich, “Using social and economic incentives to discourage Chinese suppliers from product adulteration”, *Bus. Horiz.*, vol. 57, no. 4, pp. 497–508, 2014.
- [3] F. Gale and J. C. Buzby, “Imports From China and Food Safety Issues Cataloging Record”, *Econ. Res. Serv. EIB* 52, no. 52, pp. 1–32, 2009.
- [4] S. MacMahon, T. H. Begley, G. W. Diachenko, and S. A. Stromgren, “A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of economically motivated adulteration in protein-containing foods”, *J. Chromatogr. A*, no. 1220, pp. 101–107, 2012.
- [5] M. McDonalds, “From Milk to Peas, a Chinese Food-Safety Mess”, *The New York Times*, 2009. [Online]. Available: <http://rendezvous.blogs.nytimes.com/2012/06/21/from-milk-to-peas-a-chinese-food-safety-mess/>. [Accessed: Feb-2016]
- [6] Y. Feng, G. Su, H. Zhao, Y. Cai, C. Cui, D. Sun-Waterhouse, and M. Zhao, “Characterisation of aroma profiles of commercial soy sauce by odour activity value and omission test”, *Food Chem.*, vol. 167, pp. 220–228, 2015.
- [7] E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell, and U. A. Lima, “Biotecnologia Industrial - Biotecnologia na Produção de Alimentos”, vol. 4, pp. 476–485, 2001.
- [8] B. S. Luh, “Industrial production of soy sauce”, *J. Ind. Microbiol.*, vol. 14, pp. 467–741, 1995.
- [9] S. Yamamoto, T. Bamba, A. Sano, Y. Kodama, M. Imamura, A. Obata, and E. Fukusaki, “Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis”, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 114, no. 2, pp. 170–175, 2012.
- [10] T. Yokotsuka, “Soy sauce biochemistry” in *Advances in food Reserach*, Academic Press, pp. 195–329, 1986.
- [11] Y. Z. Yan, Y. L. Qian, F. Di Ji, J. Y. Chen, and B. Z. Han, “Microbial composition during Chinese soy sauce koji-making based on culture dependent and independent methods”, *Food Microbiol.*, vol. 34, no. 1, pp. 189–195, 2013.
- [12] T. Natcha and S. Panmanas, “Detection of Adulteration of Soy Sauce by Brine Using Near Infrared Spectroscopy,” *Ital. Oral Surg.*, vol. 2, no. 0, pp. 212–217, 2014.
- [13] Mary Roach, *Gulp: Adventures on the Alimentary Canal*. W. W. Norton & Company, 2013.
- [14] C. R. Robbins, *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 5th ed. Heidelberg Springer, 2012.
- [15] M. Hayata and J. Schofield, “Heat and additive induced biochemical transitions in gluten from good and poor breadmaking quality wheats”, *J. Cereal Sci.*, vol. 40, pp. 245–256, 2004.

-
- [16] D. Idrani and V. Rao, "Effect of additives on rheological characteristics and quality of wheat flour parrota", *J. Texture Stud.*, vol. 37, pp. 315–338, 2006.
- [17] L. Kim, "Teriyaki-Straight," 2015. [Online]. Available: <http://www.snopes.com/soy-sauce-made-human-hair/>. [Accessed: 10-Jun-2016].
- [18] R. K. Owusu, *FOOD PROTEIN ANALYSIS: Quantitative Effects on Processing*. 2002.
- [19] O. H. Drummer, "Postmortem toxicology of drugs of abuse", *Forensic Sci. Int.*, vol. 142, no. 2–3, pp. 101–113, 2004.
- [20] Z. Chengzheng, L. Zhimin, Z. Dong, L. Yanhong, L. Jianhui, T. Yilang, L. Zeyuan, and Z. Jiawang, "Drug abuse in China", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1025, pp. 439–445, 2004.
- [21] L. Lu, Y. Fang, and X. Wang, "Drug abuse in China: Past, present and future", *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 28, no. 4, pp. 479–490, 2008.
- [22] B. Lockwood, *Ketamine: Dangerous Hallucinogen*. The Rosen Publishing Group, Inc, 2007.
- [23] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. JOHN WILEY & SONS, INC, 2003.
- [24] N. J. K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 2000.
- [25] Phenomenex, "SPE Reference Manual & Users Guide", 2014.
- [26] I. C. S. F. Jardim, "Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas", *Sci. Chromatogr.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–25, 2010.
- [27] D. A. Skoog, H. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Belmont: Thomson & Brooks/Cole, 2007.
- [28] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 6th ed. New York W. H. Freeman, 2003.
- [29] H.-J. Hübschmann, *Fundamentals in Handbook of GC/MS*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [30] M. Wood, M. Laloup, S. Nele, M. Fernandez, E. A. Bruijn, and R. A. A. Maes, "Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science", *J. Chromatogr. A*, no. 1130, pp. 3–15, 2006.
- [31] H. H. Maurer, "Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology", *J. Chromatogr. B*, no. 713, pp. 3–25, 1998.
- [32] D. Thieme and H. Sachs, "Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, vol. 57, pp. 497–508, 2003.
- [33] B. K. Matuszewski, M. L. Consstanzer, and C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS", *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 13, pp. 3019–3030, 2003.
- [34] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, and J. R. Mazzeo, "Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses", *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 852, no. 1–2, pp. 22–34, 2007.
- [35] X. Wang, S. Wang, and Z. Cai, "The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis", *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 52, pp. 170–185, 2013.
- [36] P. Wanakhachornkrai and S. Lertsiri, "Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce", *Food Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 619–629, 2003.
-

- [37] H. Yamaguchi and R. Uchida, "Determination of nicotianamine in soy sauce and other plant-based foods by LC-MS/MS", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 40, pp. 10000–10006, 2012.

Referências da Parte Experimental:

- [1] J. Kenkel, *Analytical Chemistry for Technicians*, 3rd Editio. Lewis Publishers, 2003.
- [2] H.-J. Hübschmann, *Fundamentals in Handbook of GC/MS*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [3] I. González-Mariño, J. B. Quintana, I. Rodríguez, and R. Cela, "Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 11, pp. 1748–1760, 2010.
- [4] B. K. Matuszewski, M. L. Consstanzer, and C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS", *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 13, pp. 3019–3030, 2003.

Referências de Resultados e Discussão:

- [1] O. Magnusson, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2014.
- [2] L. Huber, "Validation of Analytical Methods", *Agil. Technol.*, vol. 2, p. 65, 2010.
- [3] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, and J. R. Mazzeo, "Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses", *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 852, no. 1–2, pp. 22–34, 2007.
- [4] N. M. Cassiano, J. C. Barreiro, L. R. R. Martins, R. V. Oliveira, and Q. B. Cass, "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas", *Quim. Nova*, vol. 32, no. 4, pp. 1021–1030, 2009.
- [5] B. K. Matuszewski, M. L. Consstanzer, and C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS ", *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 13, pp. 3019–3030, 2003.

**Parte II – Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica Alternativa para
Despistagem de Novas Substâncias Psicoativas em Saliva**

Referências da Introdução:

- [1] R. Sutherland, A. Peacock, E. Whittaker, A. Roxburgh, S. Lenton, A. Matthews, K. Butler, M. Nelson, L. Burns, and R. Bruno, “New psychoactive substance use among regular psychostimulant users in Australia, 2010-2015”, *Drug Alcohol Depend.*, pp. 2010–2015, 2015.
- [2] C. Margalho, A. Castanheira, F. C. Real, E. Gallardo, and M. López-Rivadulla, “Determination of ‘new psychoactive substances’ in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography-mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1020, pp. 14–23, 2016.
- [3] V. Calado, “Novas Substâncias Psicoativas. O caso da Salvia Divinorum,” 2013.
- [4] C. L. German, A. E. Fleckenstein, and G. R. Hanson, “Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon”, *Life Sci.*, vol. 97, no. 1, pp. 2–8, 2014.
- [5] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, *Relatório Europeu sobre Drogas*. 2016.
- [6] J. B. Zawilska and D. Andrzejczak, “Next generation of novel psychoactive substances on the horizon - A complex problem to face”, *Drug Alcohol Depend.*, vol. 157, pp. 1–17, 2015.
- [7] A. McAuley, G. Hecht, L. Barnsdale, C. S. Thomson, L. Graham, S. Priyadarshi, and J. R. Robertson, “Mortality related to novel psychoactive substances in Scotland, 2012: An exploratory study”, *Int. J. Drug Policy*, vol. 26, no. 5, pp. 461–467, 2015.
- [8] D. P. Katz, D. Bhattacharya, S. Bhattacharya, J. Deruiter, C. R. Clark, V. Suppiramaniam, and M. Dhanasekaran, “Synthetic cathinones: ‘A khat and mouse game’”, *Toxicol. Lett.*, vol. 229, no. 2, pp. 349–356, 2014.
- [9] R. C. Dart, A. C. Bronstein, D. a Spyker, L. R. Cantilena, S. a Seifert, S. E. Heard, and E. P. Krenzelok, “Poisoning in the United States: 2012 emergency medicine report of the national poison data system”, *Ann. Emerg. Med.*, vol. 65, no. 4, pp. 416–22, 2015.
- [10] M. P. De Abreu, “Decreto-Lei nº54/2013 de 17 de Abril, Diário da República 1ª série – Nº75,” pp. 2250–2257, 2013.
- [11] M. J. Valente, P. Guedes De Pinho, M. De Lourdes Bastos, F. Carvalho, and M. Carvalho, “Khat and synthetic cathinones: A review”, *Arch. Toxicol.*, vol. 88, no. 1, pp. 15–45, 2014.
- [12] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “Injection of synthetic cathinones”, *Perspect. drugs*, vol. a, 2014.
- [13] M. Capriola, “Synthetic cathinone abuse”, *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.*, vol. 5, pp. 109–115, 2013.
- [14] M. Coppola and R. Mondola, “Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as ‘ bath salts’ or ‘ plant food’”, *Toxicol. Lett.*, vol. 211, no. 2, pp. 144–149, 2012.
- [15] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2015. Trends and Developments*. 2015.

-
- [16] J. M. Prosser and L. S. Nelson, "The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones", *J. Med. Toxicol.*, vol. 8, no. 1, pp. 33–42, 2012.
- [17] J. B. Zawilska and J. Wojcieszak, "Designer cathinones-An emerging class of novel recreational drugs", *Forensic Sci. Int.*, vol. 231, no. 1–3, pp. 42–53, 2013.
- [18] C. Laker, F. Callard, C. Flach, P. Williams, J. Sayer, and T. Wykes, "The challenge of new psychoactive substances", *Unodc*, vol. 9, no. 23, 2014.
- [19] L. Institóris, Z. Árok, K. Seprenyi, T. Varga, G. Sára-Klausz, É. Keller, R. A. Tóth, L. Sala, É. Kereszty, and K. Róna, "Frequency and structure of stimulant designer drug consumption among suspected drug users in Budapest and South-East Hungary in 2012–2013", *Forensic Sci. Int.*, vol. 248, pp. 181–186, 2015.
- [20] M. Coppola and R. Mondola, "3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV): Chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online", *Toxicol. Lett.*, vol. 208, no. 1, pp. 12–15, 2012.
- [21] J. Rácz, R. Csák, K. T. Tóth, E. Tóth, K. Rozmán, and V. A. Gyarmathy, "Veni, vidi, vici: The appearance and dominance of new psychoactive substances among new participants at the largest needle exchange program in Hungary between 2006 and 2014", *Drug Alcohol Depend.*, vol. 158, pp. 154–158, 2016.
- [22] S. F. Imam, H. Patel, M. Mahmoud, N. A. Prakash, M. S. King, and R. D. Fremont, "Bath salts intoxication: A case series", *J. Emerg. Med.*, vol. 45, no. 3, pp. 361–365, 2013.
- [23] L. Iversen, M. White, and R. Treble, "Designer psychostimulants: Pharmacology and differences", *Neuropharmacology*, vol. 87, pp. 59–65, 2014.
- [24] K. S. Hagan and L. Reidy, "Detection of synthetic cathinones in victims of sexual assault", *Forensic Sci. Int.*, vol. 257, pp. 71–5, 2015.
- [25] A. M. Leffler, P. B. Smith, A. de Armas, and F. L. Dorman, "The analytical investigation of synthetic street drugs containing cathinone analogs", *Forensic Sci. Int.*, vol. 234, no. 1, pp. 50–56, 2014.
- [26] S. Elliott and J. Evans, "A 3-year review of new psychoactive substances in casework", *Forensic Sci. Int.*, vol. 243, pp. 55–60, 2014.
- [27] Unodoc - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, "Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials", *Unodoc*, p. 23, 2015.
- [28] M. R. Meyer, "Trends in analyzing emerging drugs of abuse - From seized samples to body samples", *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 25, pp. 6105–6110, 2014.
- [29] A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, T. Saito, and M. Nagao, "Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones", *Forensic Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 175–194, 2015.
- [30] D. A. Skoog, H. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Belmont: Thomson & Brooks/Cole, 2007.
- [31] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 6th ed. New York W. H. Freeman, 2003.
- [32] H.-J. Hübschmann, *Fundamentals in Handbook of GC/MS*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [33] O. D. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press, 2011.
- [34] C. F. Poole, *Gas Chromatography*, 1st ed. Elsevier Inc., 2012.
-

- [35] M. L. Banks, T. J. Worst, D. E. Rusyniak, and J. E. Sprague, "Synthetic cathinones ('Bath Salts')", *J. Emerg. Med.*, vol. 46, no. 5, pp. 632–642, 2014.
- [36] F. Westphal, T. Junge, B. Klein, G. Fritschi, and U. Girreser, "Spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxy-pyrrolidinobutyrophenone: A new designer drug with α -pyrrolidinophenone structure", *Forensic Sci. Int.*, vol. 209, no. 1–3, pp. 126–132, 2011.
- [37] S. Kerrigan and D. Ph, "Improved Detection of Synthetic Cathinones in Forensic Toxicology Samples: Thermal Degradation and Analytical Considerations," 2015.
- [38] T. Saito, A. Namera, M. Osawa, H. Aoki, and S. Inokuchi, "SPME–GC–MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case", *Forensic Toxicol.*, vol. 31, no. 2, pp. 328–332, 2013.
- [39] S. Kerrigan, M. Savage, C. Cavazos, and P. Bella, "Thermal degradation of synthetic cathinones: Implications for forensic toxicology", *J. Anal. Toxicol.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [40] J. DeRuiter, L. Hayes, A. Valaer, and C. R. Clark, "Methcathinone and Designer Analgesics: Synthesis, Stereochemical Analysis and Analytical Properties", *Journal of Chromatographic Science*, Vol.32, pp. 552–564, 1994.
- [41] L. A. Reitzel, P. W. Dalsgaard, I. B. Müller, and C. Cornett, "Identification of ten new designer drugs by GC-MS, UPLC-QTOF-MS, and NMR as part of a police investigation of a Danish Internet company", *Drug Test. Anal.*, vol. 4, no. 5, pp. 342–354, 2012.
- [42] K. Tsujikawa, K. Kuwayama, T. Kanamori, Y. T. Iwata, and H. Inoue, "Thermal degradation of α -pyrrolidinopentylphenone during injection in gas chromatography / mass spectrometry" *ForensicSci Int.*, vol. 231, no.1-3, pp. 296-9, 2013.
- [43] J. M. F. Nogueira, "Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques", *Anal. Chim. Acta*, vol. 757, pp. 1–10, 2012.
- [44] W. J.D. and S. MITRA, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, vol. 162. 2003.
- [45] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, and H. Nakazawa, "Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 40, no. 3, pp. 500–508, 2006.
- [46] E. Baltussen, C. A. Cramers, and P. J. F. Sandra, "Sorptive sample preparation - A review", *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 3–22, 2002.
- [47] F. David and P. Sandra, "Stir bar sorptive extraction for trace analysis", *J. Chromatogr. A*, vol. 1152, no. 1–2, pp. 54–69, 2007.
- [48] J. M. F. Nogueira, "Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática", *Sci. Chromatogr.*, vol. 5, no. 4, pp. 275–283, 2013.
- [49] N. R. Neng, A. R. M. Silva, and J. M. F. Nogueira, "Adsorptive micro-extraction techniques- Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media", *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 47, pp. 7303–7310, 2010.
- [50] C. Almeida, R. Strzelczyk, and J. M. F. Nogueira, "Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices", *Talanta*, vol. 120, pp. 126–134, 2014.
- [51] C. Almeida, "Microextração Adsorptiva Em Barra (Ba μ e) - Fundamentos, Avanços e Aplicações na Análise Vestigial de Compostos Emergentes em Matrizes Reais", Tese de Doutorado em Química Analítica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 2014.
- [52] N. Neng, "Desenvolvimento de Novas Metodologias Analíticas Conducentes à Monitorização de Poluentes Orgânicos Prioritários em matrizes Aquosas", Tese de Doutorado em Química Analítica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 2011.

- [53] S. Ahmad, “Micro-extração Adsorptiva Aplicada na Análise de Esteróides Anabólicos em Contexto de Controlo Anti- doping”, Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2013.
- [54] R. Sequeiros, “Aplicação de Novas Metodologias Analíticas no Estudo de Compostos Fenólicos em Matrizes Alimentares”, Dissertação de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2008.
- [55] J. Bernarda, “Determinação Vestigial de Agroquímicos em Matrizes Aquosas por Micro-extração Adsorptiva em Barra (BA μ E)”, Dissertação de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2014.
- [56] W. Schramm and R. W. Smith, “Drugs of Abuse in Saliva: A Review,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 16, pp. 1–9, 1991.
- [57] M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamariña, K. Perez, and R. de la Torre, “A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 44, no. 2, pp. 594–601, 2007.
- [58] A. de Castro, E. Lendoiro, H. Fernández-Vega, S. Steinmeyer, M. López-Rivadulla, and A. Cruz, “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1374, pp. 93–101, 2014.
- [59] S. Strano-Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignano, F. S. Romolo, and M. Chiarotti, “Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, ‘spice’ and stimulants in oral fluid”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1258, no. Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., pp. 37–42, 2012.
- [60] P. Amaratunga, B. L. Lemberg, and D. Lemberg, “Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid”, *J. Anal. Toxicol.*, vol. 37, no. 9, pp. 622–628, 2013.
- [61] K. M. Mohamed, A. J. Al-Hazmi, A. M. Alasiri, and M. E. Ali, “A GC–MS Method for Detection and Quantification of Cathine, Cathinone, Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid”, *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, no. 8, pp. 1271–1276, 2016.
- [62] D. Correll and D. M. Correll, “Development of a Rapid SPME / GC-MS Method for the Detection and Quantification of Synthetic Cathinones in Oral Fluid”, *Trinity Coll. Digit. Repos.*, 2013.

Referências da Parte Experimental:

- [1] N. R. Neng, A. R. M. Silva, and J. M. F. Nogueira, “Adsorptive micro-extraction techniques- Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 47, pp. 7303–7310, 2010.

Referências dos Resultados e Discussão:

- [1] S. Kerrigan and D. Ph, “Improved Detection of Synthetic Cathinones in Forensic Toxicology Samples: Thermal Degradation and Analytical Considerations”, 2015.
- [2] D. Zuba, “Identification of cathinones and other active components of ‘legal highs’ by mass spectrometric methods”, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 32, pp. 15–30, 2012.
- [3] P. Kavanagh, J. O’Brien, J. Fox, C. O’Donnell, R. Christie, J. D. Power, and S. D. McDermott, “The analysis of substituted cathinones. Part 3. Synthesis and characterisation of 2,3-methylenedioxy substituted cathinones”, *Forensic Sci. Int.*, vol. 216, no. 1–3, pp. 19–28, 2012.
- [4] C. Rafael and Q. Leal, “Mass Spectrometry Library of NPS: Isolation and Characterisation of Designer Drugs from Herbal Incenses and Plant Feeders”, *Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* 2015.
- [5] K. Tsujikawa, K. Kuwayama, T. Kanamori, Y. T. Iwata, and H. Inoue, “Thermal degradation of a -pyrrolidinopentiophenone during injection in gas chromatography / mass spectrometry”, *ForensicSci Int.*, vol. 231, no.1-3, pp. 296-9, 2013.
- [6] J. F. Casale and P. a Hays, “The Characterization of α -Pyrrolidinopentiophenone”, *Microgram J.*, vol. 9, no. 1, pp. 33–38, 2012.
- [7] D. Springer, F. T. Peters, G. Fritschi, and H. H. Maurer, “Studies on the metabolism and toxicological detection of the new designer drug 4 9 -methyl- a -pyrrolidinopropiophenone in urine using gas chromatography – mass spectrometry”, vol. 773, pp. 25–33, 2002.
- [8] F. Westphal, T. Junge, B. Klein, G. Fritschi, and U. Girreser, “Spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxy-pyrrolidinobutyrophenone: A new designer drug with α -pyrrolidinophenone structure”, *Forensic Sci. Int.*, vol. 209, no. 1–3, pp. 126–132, 2011.
- [9] M. Coppola and R. Mondola, “3,4-Methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV): Chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online”, *Toxicol. Lett.*, vol. 208, no. 1, pp. 12–15, 2012.
- [10] J. M. F. Nogueira, “Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática”, *Sci. Chromatogr.*, vol. 5, no. 4, pp. 275–283, 2013.
- [11] J. M. F. Nogueira, “Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 757, pp. 1–10, 2012.
- [12] P. Amaratunga, B. L. Lemberg, and D. Lemberg, “Quantitative measurement of synthetic cathinones in oral fluid,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 37, no. 9, pp. 622–628, 2013.
- [13] A. de Castro, E. Lendoiro, H. Fernández-Vega, S. Steinmeyer, M. López-Rivadulla, and A. Cruz, “Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1374, pp. 93–101, 2014.
- [14] N. R. Neng, A. R. M. Silva, and J. M. F. Nogueira, “Adsorptive micro-extraction techniques- Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 47, pp. 7303–7310, 2010.
- [15] S. Ahmad, “Micro-extração Adsorptiva Aplicada na Análise de Esteróides Anabólicos em Contexto de Controlo Anti- doping”, *Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*, 2013
- [16] S. Kerrigan, M. Savage, C. Cavazos, and P. Bella, “Thermal degradation of synthetic cathinones: Implications for forensic toxicology”, *J. Anal. Toxicol.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2016.

- [17] J. DeRuiter, L. Hayes, A. Valaer, and C. R. Clark, “Methcathinone and Designer Analgues: Sinthesis, Stereochemical Analysis and Analytical Properties”, *Journal of Chromatographic Science*, Vol.32, pp. 552–564, 1994.
- [18] WADA, “WADA Technical Document – TD2010IDCR WADA Technical Document – TD2010IDCR”, pp. 1–9, 2010.
- [19] O. Magnusson, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed. 2014.